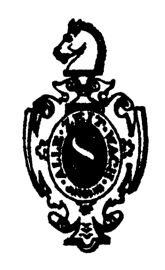
ARCHIV
FÜR
MIKROBIOLOGIE

ZEITSCHRIFT FÜR DIE ERFORSCHUNG
DER PFLANZLICHEN MIKROORGANISMEN

DREIZEHNTER BAND

Heft 1–4



BERLIN
SPRINGER-VERLAG
1943

(Aus dem Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen.)

Über das Vorkommen von Mikroorganismen in pflanzlichen Geweben (nach Untersuchungen an Früchten und Samen) *.

Von

O. Marcus.

Mit 5 Textabbildungen.

(Eingegangen am 2. Januar 1942.)

Mikroorganismen leben in pflanzlichen Geweben einerseits als Parasiten und rufen dort mehr oder weniger starke pathologische Veränderungen hervor; andererseits sind zahlreiche Fälle bekannt, in denen Mikroorganismen Symbiosen mit höheren Pflanzen eingehen und in deren Geweben leben. Die große wirtschaftliche Bedeutung, die beiden, Parasiten sowie Symbionten, zukommt, ließ ein umfangreiches Schrifttum entstehen.

Wenig beachtet, weil für die Praxis bedeutungslos, wurden einige Beobachtungen über das Vorkommen von Mikroorganismen in pflanzlichen Geweben, ohne daß Krankheitserscheinungen auftreten oder irgendein ersichtlicher Nutzen für die Pflanze entsteht. Und doch sind gerade solche Fälle biologisch besonders beachtenswert, weil sie gewissermaßen Übergänge zur parasitischen oder symbiontischen Lebensweise darstellen können. Im allgemeinen galten bisher gesunde pflanzliche Gewebe als steril. Es mehren sich aber gerade in den letzten Jahren die (oft allerdings recht zweifelhaften) Angaben, die von dem Vorkommen von Mikroorganismen in intakten pflanzlichen Geweben berichten. So erheben sich die Fragen, ob intakte pflanzliche Gewebe wirklich steril sind, und ob gegebenenfalls Beziehungen zwischen höherer Pflanze und – abgesehen von Symbionten und Parasiten – darin lebenden Mikroorganismen bestehen. Wenn hier von pflanzlichem Gewebe gesprochen wird, so soll vorerst kein Unterschied zwischen extracellularem und intracellularem Vorkommen gemacht werden.

Besprechung des Schrifttums.

Die über diese Fragen in der Literatur vorliegenden Ergebnisse sind recht verschieden. *Fernbach* schließt aus seinen Beobachtungen, daß Mikroben nicht in lebendes Gewebe einzudringen vermögen, und auch *Zinser* konnte keine Bakterien in pflanzlichen Geweben nachweisen. Dem-

* D 7.

gegenüber berichtet *Nestler* (1), daß sich im Fruchtfleisch von reifen Wacholderbeeren (*Juniperus communis*) fast stets Hyphen von *Pilzen* in mehr oder minder großer Zahl vorfänden. Das Stielchen solcher Beeren sei außen von Pilzmycel überzogen, im Innern aber frei davon. Unreife, noch grüne Beeren enthielten keine Pilzhyphen. Der Pilz wird als *Aspergillus* bezeichnet. In einer späteren Arbeit berichtet der gleiche Autor (2) über *Bakterien*, die er aus dem Innern der Paprikafrucht (*Capsicum annuum*) isolieren konnte. Es handelte sich dabei um zwei *Coccus*-Arten, von denen eine in gelben, die andere in roten Kolonien wächst; von beiden wird die Zugehörigkeit zur Gruppe des *Micrococcus roseus* vermutet. *Cauda*, der die Reife einiger Früchte wie von *Pirus communis*, *Malus silvestris*, *Mespilus germanica*, *Ceratonia siliqua*, *Phoenix dactylifera*, von *Rosa* und *Musa sapientum* untersuchte, berichtet, daß es ihm gelungen sei, aus den meisten von ihnen spezifische Mikroorganismen zu isolieren. Es handele sich um *Bacillus*- und *Micrococcus*-Arten, die er an dem Reifevorgang der Früchte für beteiligt hält; er benennt sie jeweils nach der Fruchtart, aus der sie isoliert worden sein sollen (*Bac. Piri Cauda*, *Bac. Mali Cauda* usf.). Ob sich derartige Angaben bestätigen werden, muß zur Zeit noch stark bezweifelt werden, denn es ist nicht einzusehen, warum der Reifevorgang das Werk von mehr oder weniger symbiontischen Mikroorganismen sein soll und nicht das Ergebnis eines durch die Pflanze selbst eingeleiteten physiologischen Vorganges. Im Hinblick auf *Nestlers* (2) Beobachtungen ist *Caudas* Feststellung interessant, daß sich *Bac. Piri Cauda* gut im Innern der *Capsicum*-Frucht entwickeln soll, eine Eigenschaft, die wohl nicht auf eine Spezifität des beschriebenen Bazillus schließen ließe.

Zu einem anderen Ergebnis gelangte *Wöller*. Er konnte im Innern von Pflanzen (er untersuchte allerdings keine Früchte) niemals Bakterien finden, „so daß das Pflanzeninnere als steril angesehen werden muß". Die *auf* der Pflanzenoberfläche normalerweise zahlreich vorkommenden Bakterien dringen nur bis zum Porus der Atemöffnung vor. — Auch *Berthold*, der die gleiche Frage untersuchte und zu diesem Zwecke krautiges Gewebe sowie Holz auf das Vorkommen von Mikroorganismen prüfte, kommt zu dem Schluß, daß normales pflanzliches Gewebe im Innern steril sei. Auch könne man sich vorerst an die Angaben von *Clauditz* halten, wonach zu parasitischem Leben in der Pflanze nicht befähigte Bakterien nicht durch die Wurzel in das Gewebe gelangen könnten.

Miehe dagegen berichtet, daß es ihm nie gelang, trotz Beachtung aller aseptischer Kautele, Samen aus Kürbissen (*Cucurbita Pepo*) steril zu gewinnen. Die Kürbisfrucht müsse schon von vornherein Bakterien enthalten, denn sie seien „in solchem Maße und so regelmäßig" aufgetreten, „daß Fehler in der Methodik nicht als Erklärung herangezogen werden konnten".

In verschiedenen Arbeiten[1] teilt *Niethammer* mit, daß sie aus Früchten und Samen die verschiedenartigsten Pilze isoliert habe. Soweit es sich um das auch in der vorliegenden Arbeit untersuchte Pflanzenmaterial handelt, sind die Befunde in Tabelle X, S. 38, zusammen mit meinen eigenen, zusammengestellt. Von weiteren Angaben sei erwähnt, daß im Fruchtfleisch von *Malus silvestris* Konidien von *Fusarium solani* und *F. lateritium* gefunden worden sein sollen; im Fruchtfleisch von *Cucurbita melo* wurden Pilzhyphen gesehen, die sich in Kultur zu *Penicillium expansum* entwickelten.

[1] Die in dieser Zeitschrift auf die vorliegende Veröffentlichung folgende Arbeit von *Niethammer* konnte nicht mehr berücksichtigt werden.

In Getreidefrüchten sollen Pilze bis in die Aleuronzellen vordringen. Hier sei auch noch auf die Angaben von *Peklo* hingewiesen, wonach in der Aleuronschicht der Gramineenfrüchte regelmäßig Pilze vorkommen und die Aleuronkörner Produkte des Pilzes sein sollen, eine Ansicht, die indessen nicht ernsthaft in Betracht gezogen werden kann. Weiter soll nach *Niethammer* aus Samen von *Soja hispida Penicillium bicolor* isoliert worden sein. An steril entnommenen Samen von *Geranium sanguineum* sei *Arthrobotrys arthrobotryoides* festgestellt worden, an (oder in?) steril entnommenen Haselnußkernen der gleiche Pilz, ferner *Cladosporium herbarum* und *Botrytis cinerea.* Vielfach sollen sich die Pilze in den Zellwänden finden, so auch in den Zellwänden des Endosperms von *Coffea arabica.*

Nach *Niethammer* soll es sich bei den von ihr festgestellten Pilzen um die natürliche Mikroflora des Standortes (Bodens) handeln, mit Ausnahme allerdings von zahlreichen *Hefen,* die sich im Kerngehäuse von *Pirus communis* fanden, dem Boden des Standortes aber fehlten. Man vergleiche hierzu noch die S. 40 der vorliegenden Arbeit gemachten Bemerkungen.

Romwalter (der ältere) und *v. Kiraly* glauben aus ihren Versuchen mit Stachelbeeren schließen zu dürfen, daß wohl von vornherein in diesen Früchten *Bakterien* und *Hefen* enthalten seien. Hierfür könnten aber die unten S. 31 mitgeteilten Versuche eine Erklärungsmöglichkeit geben, wonach Mikroorganismen etwa durch Insektenstiche in die Beeren gelangen können. Es konnten also bei den besprochenen Versuchen einzelne infizierte Beeren vorhanden gewesen sein.

Wie *Cappelletti* und *Ceruti* (9) berichten, findet sich auf den Blütennarben von Alpenpflanzen eine reiche Pilzflora, während die Gewebe des Griffels und der Samenanlagen dem Eindringen der Pilze beträchtlichen Widerstand entgegensetzen. Bei gelegentlich doch erfolgter Infektion werde die normale Entwicklung der Samen nicht gehemmt. Den höchsten Anteil an Fruchtknoteninfektionen fanden Verfasser bei *Ericaceen;* doch müssen auch derartige Infektionen bei *Rhododendron hirsutum* beobachtet worden sein, wie aus der Feststellung hervorgeht, daß für die Fruchtknoten, ebenso für die Narben eine mit der Hohenlage zunehmende Immunität beobachtet wurde.

Die neueste Literatur in der Frage der Sterilität pflanzlicher Gewebe gruppiert sich im wesentlichen um einige Arbeiten von *Schanderl* (1), die auf erheblichen Widerspruch stießen. Der Verfasser behauptet darin, daß nicht allein *Leguminosen Bakterien* als Symbionten besäßen, sondern auch eine erhebliche Zahl von Nichtleguminosen, wie *Hedera helix, Tussilago farfara, Dactylis glomerata* u. a. m. Die Symbionten seien nicht auf bestimmte Gewebepartien beschränkt, sondern fänden sich über alle Organe der Pflanze verteilt und ließen sich leicht daraus isolieren. Bedingung sei jedoch die Verwendung eines geeigneten Nährbodens, da die Symbionten in den Geweben als Bakterioden vorlägen und in diesen Nährböden zu echten Bakterien regeneriert werden müßten; als einen solchen gibt Verfasser flüssige Bohnenbrühe an; jedoch teilte er auf der Berliner Biologen-Tagung 1941 mit, daß er der Bohnenbrühe nicht mehr die spezifische Eignung zuspräche. Auch aus Früchten, wie Äpfeln, Birnen, Weinbeeren, Johannisbeeren, Tomaten, Gurken hätten sich mittels des genannten Nährbodens *Bakterien*-Symbionten, gelegentlich auch *Hefen* isolieren lassen. Mit geeigneten Färbemitteln seien die Symbionten direkt mikroskopisch nachzuweisen; als dafür besonders geeignetes Objekt werden die *Galium*-Arten genannt. In einer zweiten Arbeit bringt *Schanderl* (3) Untersuchungen an

einer Menge weiterer Pflanzen, meist Nichtleguminosen, aus denen er ebenfalls Bakteriensymbionten isoliert haben will. Eigentümlicherweise endet aber „der am häufigsten beobachtete Regenerationsvorgang" mit der Bildung von sporulierenden Zellen. Auch in der Aussprache zu dem Vortrag von *A. Rippel* anläßlich der 2. wissenschaftlichen Woche zu Frankfurt a. M., betont *Schanderl* (2) den entscheidenden Einfluß, den seiner Ansicht nach die Verwendung eines bestimmten Nährbodens auf das Gelingen der Regeneration ausübt. Diese könne eben nur in einem Nährmedium stattfinden, dessen chemisch-physikalische Konstitution der des pflanzlichen Plasmas weitgehend ähnlich sei. Erst nach erfolgter Rückbildung zu Bakterien könne auf feste Nährböden übergeimpft werden. Indessen überprüfte *Schaede* die Angaben von *Schanderl* und befaßte sich eingehend mit dem obenerwähnten *Galium*. Durch Jodreaktion konnte er zeigen, daß es sich bei den vermeintlichen „Bakterien" um Stärkekörner handelte. Bei *Galium*-Sprossen, die er bei schwacher Belichtung im Zimmer hielt, fiel nach 3 Tagen die Jod-Stärke-Reaktion negativ aus, „und es fehlten jetzt auch die ‚Bakterien'". Auch *Burcik*, der *Schanderls* Ergebnisse prüfte, konnte zu keiner Übereinstimmung der Befunde gelangen, obwohl er auch mit *Tussilago farfara* arbeitete und als Kulturmedium die von *Schanderl* empfohlene Bohnenbrühe benutzte. *K. Rippel* (1) untersuchte neben den von *Schanderl* untersuchten Pflanzen besonders die Verhältnisse bei Weinbeeren. Als Nährböden verwandte er neben Bohnenbrühe u. a. helle, ungehopfte Bierwürze, Birnensaft nach *Müller-Thurgau* und Süßmost, p_H 5. Auch er konnte weder in Weinbeeren noch in anderem Material Bakterien feststellen. Diese negativen Angaben werden erweitert durch weitere, die von dem gleichen Autor auf der Berliner Biologen-Tagung 1941 gemacht wurden. Ebenda berichteten *Burgeff* und *Gessner* über diesbezügliche negative Ergebnisse bei zahlreichen Pflanzen. Nur bei *Honkenya peploides* fand *Gessner* in 98% der Fälle Bakterien im Mesophyll. Bei gleicher Gelegenheit teilt *Ullrich* mit, daß er aus den Milbenhäuschen (Acarodomatien) von *Coprosma*- und *Coffea*-Arten Bakterien isoliert habe, niemals aber aus anderen Teilen der Pflanzen.

Schanderls Befunde glauben *Hennig* und *Villforth* bestätigen zu können. Sie erzielten aus verschiedenem pflanzlichen Material die mannigfachsten Bakterienkulturen, meist Sporenbildner. Ganz abgesehen davon, daß Bakterien von verschiedenem physiologischen Verhalten und Kulturen verschiedenster Farbe — „einige der Kulturen gerieten in Gärung, bei anderen bildeten sich verschieden gefärbte Häute, wie *Kahmhefen*" — als *Bact. radicicola Bey.* und *Azotobacter agile* bestimmt werden, leidet diese Arbeit unter einem gewissen Mangel an Sterilisationstechnik, was auch *Bortels* in seiner Kritik dieser Arbeit zum Ausdruck bringt. Nicht diskutabel dürften die Angaben von *Elfving* sein, wonach sich aus höheren Organismen durch Beschädigungen verschiedener Art (Hitze, Gifte) „künstlich" Bakterien darstellen ließen!

Endlich sei noch eine Arbeit von *Stührk* erwähnt, wonach sich aus sterilisierten Erbsen Bakterien entwickeln sollen, wenn die Erbsen zerquetscht würden. Demgegenüber betont *Stapp* bei der Berliner Biologen-Tagung 1941, daß hierbei Bakterien zur Entwicklung kommen könnten, die vor dem Zerquetschen aus Nahrungsmangel nicht anwuchsen. Eine andere Möglichkeit der Erklärung ist die, daß Luftsäcke vorhanden waren, in denen die Bakterien der Sterilisation entgingen. Durch Zerquetschen der Samen konnten die Luftsäcke zerstört werden und damit die Benetzungs-

möglichkeit für die Bakterien und somit für ihre Entwicklung gegeben sein. Nach beiden Erklärungsmöglichkeiten brauchen die Bakterien also nicht in den Samen gesessen zu haben*.

Um zu sehen, ob gewisse Beziehungen hinsichtlich der Reife zwischen Wacholderbeeren und darin aufgefundenen Pilzhyphen bestehen, beimpfte *Nestler* (1) unreife, noch keinen Pilz enthaltende Wacholderbeeren mit pilzhaltigem Fruchtfleisch gleicher Art. In der Tat seien die so infizierten Beeren rasch blau geworden, und er habe auch Pilzwachstum darin nachweisen können. Dagegen sollen in gleicher Weise verletzte, aber nicht infizierte Beeren in wiederholten Versuchen höchstens einen bläulichen Ring um die Wunde herum gezeigt haben; oft sei auch diese Reaktion ausgeblieben. Doch konnte daraus nicht auf eine notwendige Beteiligung des Pilzes am Reifungsvorgang geschlossen werden, denn es hätten sich vereinzelt auch reife Beeren gefunden, die offensichtlich keinen Pilz enthielten. *Nestler* nimmt dagegen an, daß der Pilz die Zellen im Innern der Beeren rasch abtötet und so die Farbänderung veranlaßt. Diese Annahme steht nicht in Widerspruch zu einer Mitteilung von *Harter* und *Weimer*, daß *Rhizopus*-Arten, die *Bataten* befallen, erst dann von einer frischen Schnittfläche aus in das Gewebe eindringen könnten, wenn man die ersten Zellagen abtöte oder mit Agar bestriche. Der Pilz entwickle sich zunächst in dem toten Material. Durch Enzymwirkung töte er dann einige Zellschichten vorher ab, um sich von den toten Zellen zu ernähren. Ähnliches berichtet *Müller-Thurgau* auch von *Botrytis*. So erscheint es nicht ausgeschlossen, daß durch das Einbringen des pilzhaltigen Fruchtfleisches in die intakte Wacholderbeere eine ähnliche Infektionsbasis geschaffen wurde. Daß aber solche Fragen nicht generell entschieden werden können, sondern von Fall zu Fall neu beurteilt werden müssen, zeigen Infektionsversuche von *Günnewig*, der sich bemühte, die Synthese von pilzfreien *Lolium*-Keimlingen mit dem *Lolium*-Pilz herzustellen. Er ging dabei in der Weise vor, daß er 5 Tage alte *Lolium*-Keimlinge unterhalb des Vegetationskegels mit sterilem Skalpell verwundete, in die Wunde Hyphen des *Lolium*-Pilzes einbrachte und mit *Nielsen*-Agar verschloß, da dieser für den Pilz besonders gute Wachstumsbedingungen bietet; auch brachte er Schnitte am Wurzel-

* *Anmerkung bei der Korrektur*: Soeben erhalte ich Kenntnis von der Veröffentlichung von *Szilvási*. Es wurden 136 verschiedene Pflanzenarten der verschiedensten systematischen Stellung untersucht und in 28% der Fälle bei Blättern, in 12% bei jungen Trieben, in 20% bei Blüten, in 31% bei Früchten und in 9% bei Wurzeln verschiedene *Bakterien* (und vereinzelt *Hefen*) gefunden. Darunter war z. B. *Azotobacter* 48mal vertreten (bei 38 verschiedenen Pflanzenarten). Es läßt sich indessen nicht erkennen, mit welcher Häufigkeit jeweils die gefundenen Mikroorganismen vertreten waren. Jedenfalls kann es sich auch hier nicht um wirkliche Symbiosen handeln, auch wenn die aufgefundenen Mikroorganismen wirklich aus dem Innern der Pflanzen stammen sollten, so daß die Schlüsse des Verf. in Hinsicht auf allgemein verbreitete Symbiosen abgelehnt werden müssen. Es sei nochmals ausdrücklich betont, daß es weniger darauf ankommt, bei verschiedenartigsten Pflanzen einmal Mikroorganismen zu finden als darauf, in bestimmten Einzelfällen eingehend zu zeigen, ob eine Infektion regelmäßiger vorhanden ist (falls es sich wirklich um eine solche handelt) und wie sie gegebenenfalls zu deuten ist, worüber weiter auf die unten S. 36 folgenden Ausführungen verwiesen sei.

hals der jungen Pflanzen an und beimpfte sie mit Sporen des Pilzes. Von diesen Versuchen berichtet er, daß in keinem Falle die Infektion der Keimlinge geglückt sei.

Nach *Dold* soll Honig, der ja ein Produkt aus zuckerhaltigen pflanzlichen Sekreten und Ausscheidungen aus der Biene darstellt, stark hemmend auf Bakterienwachstum wirken, und zwar durch Gehalt an thermolabilen „Inhibinen“. Auch auf Schnittflächen von rohen Kartoffeln, Mohrrüben, Gurken und Bananen würde Bakterienwachstum deutlich gehemmt. Von einer keimtötenden Wirkung der Zuckerrohrpflanzen spricht *Owen*, gegen die sich *Bacterium saccharale* zu schützen verstehe. Dabei stützt er sich auf *C. A. Brown*, der berichtet, daß die Zahl der Bakterien im frischen Zuckerrohrsaft während einiger Stunden sich vermindere, in sterilisiertem Saft dagegen von Anfang an zunähme. *Berthold* faßt die Ergebnisse seiner Untersuchungen über die Möglichkeit von Mikroorganismenleben in lebendem pflanzlichen Gewebe dahin zusammen, daß Bakterien in lebendem krautigen Gewebe sowie in Holz lange am Leben blieben, daß er aber Vermehrung von Saprophyten in gesundem Gewebe nicht beobachtet habe; auf isoliertem pflanzlichen Gewebe seien Bakterien nicht abgestorben, aber auch nicht zu irgendwelcher erkennbaren Entwicklung gelangt, wofür die Acidität allein nicht verantwortlich gemacht werden könne; außerdem schiene es erforderlich, daß das Gewebe erst tot sein müsse, ehe seine Nährstoffe den Bakterien zugänglich würden.

Zu ähnlichen Ergebnissen wie *Owen* gelangte *Söding*. Er stellte fest, daß *Bact. ozaenae* und *Bact. pneumoniae Friedl.* in Preßsaft und auf Wundstellen von Blättern von *Iris* und *Echeveria* zu wachsen vermögen. Brachte er aber diese Keime mittels Infiltrationsmethode in intaktes Blattgewebe von *Iris*, so hätte er beobachten können, daß die Bakterien innerhalb einiger Tage abgestorben seien. In Blättern von *Echeveria glauca* infiltriertes *Bact. ozaenae* stürbe zunächst „fast restlos“ ab, breite sich aber später wieder im Blatte aus. Für *Bact. prodigiosum* dagegen wird Wachstum in Preßsäften sowie in verwundetem und intaktem Blattgewebe von *Iris* und *Echeveria* angegeben, was mit den Angaben *Owens* durchaus in Einklang zu bringen ist. Nach *K. Rippel* (2) enthalten die Kotyledonen von *Erbsen*, nicht aber die Samenschalen und Samenanlage, einen auf *Hefen* giftig wirkenden Stoff, der aber bereits verschwunden ist, wenn der Keimling eine Größe von 0,5 cm erlangt hat; dagegen werde er in reifenden Samen wieder eingelagert.

Selbstverständlich kann auch eine reine Giftwirkung in Frage kommen, wie z. B. das Anemonin nach *Boas*, das *Ranunculus acer* seine hohe mikrobicide Wirkung verleiht, im Gegensatz zu dem wenig wirksamen *R. repens*. Ähnliches dürfte wohl auch der Fall sein bei der von *Moriondi* angegebenen Hemmung des Wachstums von Bakterien durch den Saft von *Allium sativum*, während der Saft von *A. Cepa* nicht hemmt.

Das Wechselspiel zwischen Samen bzw. Früchten und daraus isolierter Pilze wurde von *Niethammer* untersucht. In einer Versuchsreihe wurde der Einfluß von Kulturflüssigkeit der Pilze *Penicillium expansum, Trichoderma Koningi* — von *Weizen* isoliert — und *Rhizopus nigricans* auf die Samenkeimung von *Secale cereale* untersucht. Dazu wurde Saatgut der Jahre 1937 und 1917 verwendet. Während in der Keimfähigkeit und im Keimungsverlauf des Materials von 1937 keine Unterschiede festzustellen waren, soll das mit Kulturflüssigkeit der drei genannten Pilze behandelte Saatgut des Jahres 1917 eine wesentliche Erhöhung der Keimfähigkeit

gezeigt haben. In einer zweiten Versuchsreihe wurde Kulturflüssigkeit von *Rhizopus nigricans* auf ihre Wirkung geprüft. Auch hier sei der Keimungsverlauf des Saatgutes von *Secale cereale* der Jahre 1936/37 unbeeinflußt geblieben, während das Saatgut von 1917 die Behandlung mit verbrauchter Kulturflüssigkeit wieder erhebliche Steigerung der Keimfähigkeit zur Folge hatte. Daß es sich hier um Wuchsstofflieferung seitens des Pilzes gehandelt haben müßte, geht aus der Bemerkung hervor, daß die gleiche Erhöhung der Keimfähigkeit bei dem 20 Jahre alten Saatgut durch Zusatz von Wuchsstoff aus Roggenkörnern des Jahres 1937 erzielt worden sei.

Andererseits scheint zuweilen auch von der höheren Pflanze eine Begünstigung des Pilzwachstums auszugehen, wie weitere Beobachtungen von *Niethammer* (5) zeigen. Danach sollen einige Pilze, die aus verschiedenen Früchten isoliert worden seien, auf gereinigten Zuckerlösungen nur kümmerlich gewachsen sein; seien aber kleine Stückchen aus unterschiedlichen Teilen der Samen oder Früchte der Nährlösung zugesetzt worden, so hätte Mycelwachstum und Fruktifikation „bei manchen, nicht allen Arten“ gefördert werden können. Auch diese Beobachtungen weisen auf Beziehungen hin, die offenbar zwischen höheren Pflanzen und in deren Geweben lebenden Mikroorganismen bestehen können, deren Art in großen Zügen wohl zu erkennen, im einzelnen aber noch ungeklärt ist. Daß im übrigen zwischen den als Symbionten auftretenden Mikroorganismen und der Wirtspflanze enge Wechselbeziehungen bestehen, ist aus zahlreichen Untersuchungen bekannt; auf diese Frage soll hier nicht eingegangen werden (Literatur bei *A. Rippel*).

Abschließend soll noch auf das Zusammenleben eines Pilzes mit einigen *Lolium*-Arten, besonders *Lolium temulentum*, hingewiesen werden. Es handelt sich hier wohl um einen biologisch beachtenswerten Fall, wo sich das Zusammenleben der Partner schon stark der Grenze zwischen Symbiose und Parasitismus zu nähern scheint. *Vogl* entdeckte zuerst den Pilz in Früchten von *Lolium temulentum*, und *Hiltner* glaubte eine geringe Bindung des Luftstickstoffs durch den Pilz feststellen zu können, so daß die Annahme einer echten Symbiose gerechtfertigt schien. *Rayner* stützt sich bei ihren Angaben auf die Untersuchungen von *McLennan*, wonach Früchte von *Lolium temulentum* aus verschiedenen Erdteilen mit dem gleichen Pilz infiziert gefunden wurden. Der Pilz breite sich nach dem Griffel und dem Nucellus hin aus; er werde aber durch Absorption des Mycels in seiner Ausbreitung gehemmt und diene allem Anschein nach dem sich entwickelnden Embryo als Nahrungsquelle. Gewöhnlich werde zwischen Schale und Endosperm eine Dauermycelschicht gebildet; überwiege aber die Absorption des Mycels durch das Gewebe, so unterbleibe die Bildung der Dauermycelschicht, und es fänden sich nur Hyphen im Scutellum- und Embryogewebe. Offenbar kämen in *Lolium temulentum* zwei verschiedene Pilze vor, einer in den Wurzeln, der andere in Sproß und Früchten. Während *Peyronel* den Pilz in den Wurzeln für einen *Phycomyceten* halte, glaubt *Rayner* den Pilz der Sproßteile und Früchte zu den *Ustilagineen* stellen zu müssen. *Günnewig* bestimmte den Pilz als *Chaetomium Kunzeanum Zopf*. Aus seinen Untersuchungen schließt er, daß der Pilz nicht imstande sei, den N der Luft zu assimilieren und auch sonst der Pflanze keine Vorteile biete; hingegen hätten sich infizierte Pflanzen gegenüber pilzfreien als in ihrer Konstitution geschwächt erwiesen.

Es mag hier noch erwähnt werden, daß sich in den reifen (nicht den degenerierten) Früchten und in der Mikrophyle der Samen der *Rafflesiacee*

Mitrostemon Yamamotoi stets die Chlamydosporen eines Pilzes finden (*Watanabe*). Ferner sei noch hingewiesen auf den Fall von *Pavetta indica var. tomentosa* mit Bakterien in den Samen, ohne daß Blattknoten vorhanden sind, weiter auf das Vorkommen von Bakterien im Samen (zwischen Schale und Keimling) von Wasserkelchpflanzen wie *Spathodea* (*v. Faber*).

Überblickt man die vorliegende Literatur im ganzen, so ergibt sich folgendes Bild: Aus Früchten und Samen werden eine Anzahl Isolierungen von Mikroorganismen beschrieben; dabei handelt es sich um *Bakterien-*, *Hefe-* und *Pilz*-Arten. Die Angaben über Bakteriensymbiosen von Nichtleguminosen und Totalinfektion der Pflanze durch den Symbionten stehen bisher vereinzelt und sind vorerst durchaus zweifelhaft. Offenbar bestehen Wechselwirkungen zwischen Samen bzw. Früchten und den aus ihnen isolierten Mikroorganismen, wobei indessen nicht zu entscheiden ist, wieweit diese Wechselwirkungen spezifische Vorkommen bedingen [vgl. *Calluna*-Mykorrhiza (*Freisleben*)]. Das fast regelmäßige Vorkommen von *Chaetomium Kunzeanum* im Gewebe von *Lolium temulentum* wird mehr für einen Parasitismus seitens des Pilzes als für eine Symbiose gehalten.

Eigene Untersuchungen.

I. Das Vorkommen von Mikroorganismen in Früchten und Samen.

Entsprechend den eingangs aufgeworfenen Fragen sollten die vorliegenden Untersuchungen in der Hauptsache feststellen, ob sich in dem zur Untersuchung gelangenden Material Mikroorganismen vorfinden, und in welchem Umfange etwa mit Infektionen gerechnet werden muß. Außerdem wurden einige ergänzende Versuche angestellt, ob etwa wechselseitige Beziehungen zwischen höherer Pflanze und den gegebenenfalls darin vorkommenden Mikroorganismen aufzudecken seien.

Meine Untersuchungen erstreckten sich auf Früchte und Samen verschiedener Art- und Familienzugehörigkeit. Die sich daraus ergebenden außerordentlichen Schwankungen in der Größe der Versuchsobjekte lassen es vorteilhaft erscheinen, die Versuchsmethoden den jeweils gegebenen Verhältnissen anzupassen. So soll hier bewußt auf eine gesonderte Behandlung der Methodik verzichtet und bei der Behandlung des jeweiligen Materials näher darauf eingegangen werden. Die Einordnung des Materials folgt nach der Reihe der systematischen Stellung der betreffenden Arten. Dabei werden Untersuchungen an *Erdbeeren* und *Himbeeren* weggelassen, weil hier die Infektionsgefahr zu groß ist.

Juniperus communis L. (Wacholder).

Die Beobachtungen von *Nestler* (1) über das Vorkommen von Pilzhyphen in Wacholderbeeren veranlaßten mich, diese Früchte in meine Untersuchungen einzubeziehen. Wenn im folgenden die Frucht des

Wacholders als „Beere" bezeichnet wird, so nur der Kürze halber in Anlehnung an den allgemeinen Sprachgebrauch; ihr Charakter als „Zapfenbeere" soll dadurch in keiner Weise berührt werden.

Das zur Untersuchung gelangende Material stammt zunächst teils aus der Umgebung Göttingens, teils aus der Gegend um Homberg, Bez. Kassel, aus Höhenlagen von 250—300 m über NN. Die Einerntung erstreckte sich auf die Zeit vom März bis Mitte Juli 1941. Von Wacholdersträuchern wurden kleine Zweige, die möglichst reich mit einwandfrei aussehenden, teils reifen, teils noch unreifen Beeren besetzt waren, abgeschnitten und sofort in gut schließende Papierbeutel gebracht. Die Untersuchung wurde möglichst noch am gleichen Tage, spätestens aber am folgenden Tage vorgenommen. Dazu wurden vollständig gesund aussehende Beeren von den Zweigen abgetrennt und auch das Stielchen entfernt, ohne aber die Frucht selbst zu verletzen. Zur Beseitigung von gröberen, auf der Schale haftenden Verunreinigungen wurden die Beeren zuerst mit in Wasser angefeuchtetem Wattebausch abgerieben, darauf wurden noch verbliebene Reste der Wachsschicht durch wiederholtes Abreiben mit Xylol entfernt. Anschließend folgten ein 2—3 Minuten dauerndes Bad in 0,2%iger $HgCl_2$-Lösung, und mit sterilem, destilliertem Wasser wurde 5—10 Minuten nachgespült. Jetzt konnten die Beeren äußerlich als steril gelten. Von jeder so vorbehandelten Beere wurden zwischen sterilem Holundermark schnell vier bis sechs möglichst dünne Schnitte mit in der Flamme keimfrei gemachtem Rasiermesser hergestellt. Das zum Schneiden bestimmte sterile Holundermark bereitet man sich zweckmäßig vorher in ausreichender Menge, indem man einige Stangen Holundermark in etwa 2 cm lange, runde Klötzchen zerschneidet und diese wieder der Länge nach aufspaltet. Damit füllt man einige Reagensröhrchen und achtet darauf, daß die Hälften der Klötzchen stets gut nebeneinander bleiben; die Röhrchen werden dann in üblicher Weise mit Wattepfropfen verschlossen und im Autoklaven bei + 120° C 20 Minuten lang sterilisiert.

Obwohl zur mikroskopischen Untersuchung der Schnitte das Anfärben derselben ohne Schaden hätte unterbleiben können, wurde es dennoch durchgeführt, um etwa vorhandene Feinheiten nicht zu übersehen. Von den zur Untersuchung gelangenden Beeren wurde je ein Teil der Schnitte nach der Methode von *D. Alcorn* und *C. C. Yeager* mit Orseillin BB gefärbt. Diese Methode besitzt den Vorzug, etwa vorhandene Pilzhyphen innerhalb kurzer Zeit kräftig rot anzufärben, so daß sie sich von dem weniger stark bzw. gar nicht gefärbten Gewebe abheben. Der ihr anhaftende Mangel liegt jedoch darin, daß in so behandelten Schnitten anwesende Mikroorganismen abgetötet werden. Da bei dem restlichen Teil der Schnitte aber Wert darauf gelegt wurde, etwa darin lebende Mikroorganismen am Leben zu erhalten, fand eine auch von *Niethammer* (4) zur Färbung von Pilzhyphen verwendete wässerige Lösung von Oxaminblau 4 R Verwendung. Die günstige Konzentration scheint nicht für alle Objekte die gleiche zu sein, und auch *Niethammer* (4) sagt nichts über die Stärke der von ihr verwendeten Farblösung. Zur Untersuchung von Wacholderbeeren erwies sich die 0,06%ige Lösung als brauchbar, doch reicht diese Färbung hinsichtlich der Differenzierung nicht an die vorgenannte Methode heran. Aus diesem Grunde fanden beide Methoden nebeneinander Verwendung. — Die Schnitte wurden mit einem Tropfen im Autoklaven sterilisierter Oxaminblaulösung an ein abgeflammtes Deckglas geheftet und dieses auf einen ebenfalls abgeflammten

Objektträger mit Hohlschliff gelegt und mit einem Tröpfchen abgekochten destillierten Wassers an diesem angeheftet, sodann zur Kultur in einer feuchten Kammer aufbewahrt.

So wurden im ganzen etwa 50 Beeren untersucht, davon 20 unreife, der Rest ausgereifte Beeren. Das Fruchtfleisch der unreifen Beeren war ausnahmslos pilzfrei, und auch in den Hohlschliffen konnte keinerlei Pilzwachstum beobachtet werden. Von den untersuchten 30 reifen Früchten (Tabelle I) waren nur 4 im Innern pilzfrei. Die ürigen be-

Tabelle I. Vorkommen von Pilzen in *Juniperus*-Beeren.
Zahlen in % der untersuchten Beeren.

Pilzart	Herkunft der Probe aus (Anzahl der Beeren)					
	Göttingen, Kassel (30)	Werratal (10)	Lüneburger Heide (20)	Kroatien: Moslavačka (20)	Kroatien: Zagorje (6)	Kroatien: Zagreb (6)
Alternaria tenuis	13,3*	10,0	5,0	—	—	—
Hormodendron chlorinum var. nigrovirens	20,0*		—	—	—	—
Hormodendron herbarum	—	—	5,0**	—	16,7	—
Monilia	—	20,0	45,0**	—	—	—
Unbestimmbar	40,0	10,0	15,0	—	16,7	16,7
Pilzhyphen mikroskopisch beobachtet, kein Wachstum in Kultur	20,0	—		—	—	16,7
Steril	13,3	60,0	35,0	100,0	66,6	66,6

* In zwei Beeren waren die beiden Pilze vorhanden. — ** In einer Beere waren die beiden Pilze vorhanden.



Abb. 1. Schnitt aus reifer Wacholderbeere. Orseillin BB, *Sartory*sche Flüssigkeit. Vergr. 175 mal.

saßen ein von Pilzhyphen völlig durchzogenes Fruchtfleisch (Abb. 1), wobei sich zwischen den Proben aus Göttingen und aus Kassel kein Unterschied ergab. Das Mycel scheint sich nur intercellular auszubreiten; jedenfalls konnten bei dem untersuchten Material intracellular vor-

kommende Hyphen nicht festgestellt werden. Oft sind die Hyphen knorrig, dick und mehr oder weniger kurzzellig, bräunlich oder dünner, dann aber langzelliger und farblos, teils mit körnigem Inhalt oder auch hyalin. Die Dicke der Hyphen schwankt beträchtlich:

Gemessene Hyphendicken:

Präparat 1: 10,9 9,9 μ.
„ 2: 7,6, 5,3, 9,9 μ.
„ 6: 10,0, 12,0, 4,6, 10,0, 5,6, 3,3 μ.

Fruktifikationsorgane, die *Nestler* (1) selten beobachtet zu haben glaubt, konnten nicht festgestellt werden, des öfteren aber auch von ihm erwähnte Hyphen mit stark gequollenen Zellwänden (Abb. 2); wie

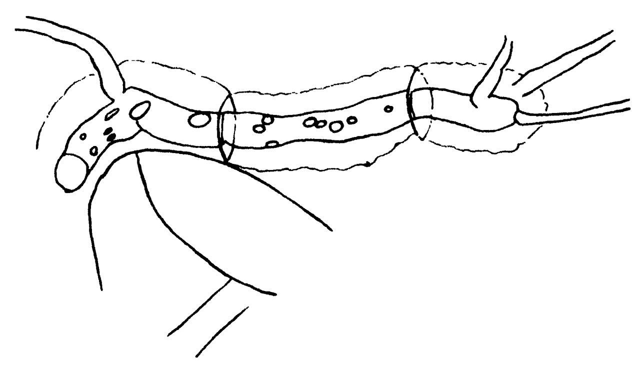


Abb. 2. Pilzhyphe aus Wacholderbeere (mit gequollenen Zellwänden). Vergr. 1100 mal.

die Abbildung zeigt, sind die Quellungsschichten in gleicher Weise gegliedert wie die Pilzhyphen, so daß es sich kaum um von der Pflanze ausgeschiedene Celluloseseheiden handeln kann: auch angestellte Reaktionen ergaben keinen Anhalt dafür.

In den Hohlschliffen entwickelte sich meist nur ein mehr oder weniger üppiges Mycel ohne Fruchtkörper, welches nach kurzer Zeit unter dem Deckglas hervorwuchs und so eine einwandfreie Beobachtung ausschloß. In fünf verschiedenen Fällen konnte mit Sicherheit Konidienbildung festgestellt werden, die die Bestimmung und Isolierung des Pilzes ermöglichte. Die Bestimmung wurde nach *Thomée-Migula* vorgenommen. In jedem dieser Fälle konnte der Pilz als *Hormodendron chlorinum var. nigrovirens (Fresen) Sacc.* bestimmt werden; jedenfalls handelte es sich nicht um eine *Aspergillus*-Art, wie *Nestler* (1) ohne nähere Bestimmung annahm. Der Pilz, dessen Standort nach der angegebenen Bestimmungstabelle auf faulenden Früchten angegeben wird, läßt sich leicht bei Zimmertemperatur auf Würzeagar und Czapek-Agar kultivieren, wo auch reichlich Konidien gebildet werden; doch

scheint ihm Würze-Agar mehr zuzusagen, worauf die üppigere Entwicklung und das schnellere Wachstum schließen lassen.

Wenn danach auch ein häufigeres Vorkommen dieses Pilzes in Wacholderbeeren erwartet werden konnte, so lag doch kein Grund dafür vor, ihn allein für die Verpilzung des Fruchtinnern verantwortlich zu machen. Im Gegenteil mußte damit gerechnet werden, daß sich noch eine Anzahl weiterer Pilze, wie u. a. auch *Alternaria*, daran beteiligen und vielleicht auch nebeneinander vorkommen. Denn in einigen Beeren fand ich auch bei den Kulturversuchen *Alternaria* (vermutlich *tenuis*) neben *Hormodendron*.

Es ist noch zu erwähnen, daß die Pilze nicht in die verholzten Schalen der Samen eindringen.

Für das Eindringen der Pilze in das Fruchtfleisch erscheint es von Bedeutung, daß die Beeren an der oberen Verwachsungsstelle der sie bildenden Schuppen drei verzahnte Nähte besitzen, deren Schluß wohl nicht immer ganz vollständig ist. Diese Annahme stützt sich auf die Beobachtung, daß bei verschiedenen weiblichen Pflanzen die Beeren oben überhaupt nicht schließen, so daß zwischen den Schuppen die Samen noch bei reifen Beeren deutlich zu erkennen sind. Solche Pflanzen weisen einen sehr hohen Anteil offensichtlich kranker Früchte auf, und es fällt selbst bei sehr starkem Behang schwer, aus noch unreifen Beeen einige gesund aussehende herauszufinden. Da die Untersuchung solcher unreifer Beeren ergab, daß das Fruchtfleisch noch pilzfrei war, so liegt der Schluß nahe, daß die unterbliebene Verwachsung der Fruchtschuppen keine durch Pilzbefall verursachte pathologische Erscheinung darstellt, sondern sicher auf eine Eigenschaft der betreffenden Einzelpflanze zurückgeführt werden muß.

Um den Zeitpunkt des Eindringens der Pilze in die Beeren zu ermitteln, wurden in Abständen von 14—21 Tagen Proben von überjährigen, unreifen Beeren untersucht. Da sich bis zur Mitte des Monats Juli in keiner gesund aussehenden unreifen Beere Anzeichen von Pilzinfektionen feststellen ließen, kann angenommen werden, daß der Befall erst nach der zweiten Julihälfte des zweiten Jahres einsetzt. Pilzisolierungen aus offensichtlich kranken und größtenteils zerstörten Früchten zeigten, daß der die Erkrankung verursachende Pilz nicht mit dem aus gesund aussehenden Beeren isolierten *Hormodendron chlorinum var. nigrovirens* identisch war.

Nachträglich wurden noch weitere Wacholderbeeren sehr verschiedener Herkunft[1] untersucht, die ebenfalls in Tabelle I aufgeführt sind. Es ist zunächst auffallend, daß in der Probe aus dem Werratal (Südhang des von Werleshausen zum Hanstein führenden Tales), von der einige Beeren mikroskopisch Pilzhyphen zeigten, das oben erwähnte *Hormodendron* fehlte, obwohl die Stelle fast genau in der Mitte zwischen

[1] Für die Überlassung des Materials danke ich den Herren Dr. *Starc*, Dr. *R. Meyer* und Prof. *Rippel*.

der Kasseler und Göttinger Stelle liegt (südostwärts dieser Linie). Dafür war wie dort *Alternaria tenuis* vorhanden, ferner war eine *Monilia* stark vertreten. Der Anteil der sterilen Früchte war mit 60 % sehr hoch.

Die nächste Probe aus der Lüneburger Heide (Sülberg) zeigte ebenfalls mikroskopisch häufig Pilzhyphen. Wiederum fand sich, wenn auch vereinzelt, *Alternaria tenuis* und eine andere *Hormodendron*-Art, *H. herbarum* (in einer Beere zusammen mit *Alternaria*), ferner eine *Monilia* in sehr hohem Anteil. 35 % der Beeren erwiesen sich als steril.

Es folgen drei Proben aus Kroatien, und zwar von Moslavačka Gora (einem kleinen Gebirge südöstlich von Zagreb), aus Zagorje (nördlich von Zagreb) und aus Sljeme (unmittelbar bei Zagreb). Das Bild ist hier weniger mannigfaltig als bei den deutschen Proben. Es wurde nur bei der zweiten Probe *Hormodendron herbarum* identifiziert, dazu in dieser und der dritten Probe unbestimmbare Pilze. In der dritten Probe zeigte eine Beere im Schnitt Pilzhyphen, die sich mit Orseillin BB außerordentlich stark angefärbt hatten; der Inhalt war körnig, und die Hyphen zeigten an einigen Stellen, in der Mitte oder endständig, kugelige Auftreibungen. Die Querwandbildung war spärlich; im ganzen ähnelte das Bild sehr dem von *Nestler* (1) beschriebenen. Leider erfolgte kein Wachstum der Hyphen, als die Schnitte auf Würze-Schrägagar ausgelegt wurden.

Bei diesen kroatischen Proben war der Anteil der sterilen Beeren sehr hoch, und in der ersten Probe konnten sogar bei 20 Beeren weder mikroskopisch noch kulturell Pilze festgestellt werden. Da die Beeren stärker verharzt schienen als die einheimischen, wurde eine Ätherextraktion von dieser Probe und der Probe aus dem Werratal ausgeführt, die folgende Werte ergab:

Moslavačka	11,26 %	der Trockensubstanz ätherlöslich
Werratal	9,55 %	„ „ „

Der Unterschied ist wohl zu gering, als daß er in Betracht gezogen werden könnte. Immerhin bleibt natürlich noch die Möglichkeit bestehen, daß die kroatischen Proben mehr Stoffe fungicider Natur enthielten als die deutschen Proben.

Trotz des wechselnden Bildes ergeben sich doch bei den *Juniperus*-Beeren offenbar örtliche Unterschiede, sei es in der Stärke der Infektion selbst, sei es im Vorkommen bestimmter Pilze, wie es geschildert wurde. Es würde sich zweifellos lohnen, diesen Dingen auf breiterer Basis und unter stärkerer Berücksichtigung der Standortsbedingungen nachzugehen.

Gramineae.

Zur Untersuchung gelangten die Früchte der einheimischen Getreidearten, sowie eine Probe der Früchte von *Lolium temulentum* als Vergleichsmaterial. Die Ernte erfolgte in ähnlicher Weise wie die des Wacholders;

auf dem Felde wurden jeweils mehrere gesund aussehende Ähren bzw. Rispen mit nur kurzem Halmstück abgeschnitten und in gut schließendem Papierbeutel verpackt, darin getrocknet und aufbewahrt.

Die Untersuchung bot insofern eine Schwierigkeit, als die Früchte äußerlich möglichst keimfrei gemacht werden sollten; andererseits aber durften Mikroorganismen, die vielleicht in Frucht- oder Samenschale eingedrungen waren, nicht abgetötet werden. Daher wurde folgendes Verfahren angewendet: die Früchte wurden in destilliertem Wasser so lange gespült, bis sie sich vollständig benetzt hatten. Danach brachte ich sie in eine 0,2%ige Lösung von Uspulun-Universal, worin sie 3—5 Minuten verblieben. Obwohl Angaben über Chlorphenolquecksilber[1], dem wirksamen Bestandteil von Uspulun-Universal, besagen, daß es sich gut zur Sterilisation von Samen bzw. Früchten eigne, und diese bei Verwendung einer 2%igen Lösung in einer Stunde sicher keimfrei seien (Bouillonprobe), so konnte doch aus dem oben angegebenen Grunde eine so lange Einwirkungsdauer nicht in Frage kommen; denn bereits 10—15 Minuten lange Einwirkung von Uspulun-Universal erwies sich als ungünstig. Auch erscheint bei der hier gestellten Forderung die Entscheidung darüber, ob Mikroorganismen, die sich in Kontrollproben entwickeln, noch von der Oberfläche stammen, also die Entkeimung nicht ganz vollständig war, oder aber ob sie aus der Oberfläche nahegelegenen Gewebeteilen hervorgewachsen sind, nicht ohne weiteres möglich. Nach dem Uspulun-Bad spülte ich die Früchte 10 Minuten lang unter mehrmaligem Wasserwechsel in sterilem, destilliertem Wasser nach. Die Schnitte zur mikroskopischen Untersuchung wurden, wie bei Wacholder beschrieben, hergestellt.

Zur Färbung der Schnitte fanden wieder die Methoden von *D. Alcorn* und *C. C. Yeager* (1) und von *Niethammer* (4) Anwendung. Da sich aber beim Mikroskopieren die Stärkekörner als außerordentlich störend erwiesen, wurden sie bei den für die Färbung mit Orseillin BB bestimmten Schnitten durch Diastase 1 : 250 (*Merck*) bei 65° C herausgelöst, so daß die Schnitte gänzlich klar erschienen. Darauf wurden die Schnitte in sauberem destillierten Wasser kurz gespült und dann gefärbt. Bei den Schnitten, die in Hohlschliffen kultiviert werden sollten, erschien die Herauslösung der Stärke nicht zweckmäßig, da eine Schädigung etwa darin vorhandener Mikroorganismen befürchtet werden mußte; außerdem ergaben Kontrollproben, daß das verwendete Diastasepräparat nicht keimfrei war. Daher wurden die zur Kultivierung bestimmten Schnitte in sterilem destillierten Wasser ausgewaschen und in einem Tropfen Oxaminblau 4 R, wie bei Wacholder beschrieben, in einen Hohlschliff gebracht. Von jedem Korn wurden wieder eine Anzahl Schnitte hergestellt und jeweils ein Teil davon nach einer der beschriebenen Methoden untersucht. Die Färbung mit Orseillin BB zeigte sich hier der anderen noch weiter überlegen, da das Oxaminblau 4 R von den Aleuronzellen so stark gespeichert wurde, daß diese schwarzblau erschienen und keinerlei Strukturen mehr darin zu erkennen waren. Die verwendete Farblösung war 0,06%ig. Weitere Verdünnung der Farblösung hätte lediglich die Differenzierung beeinträchtigt, aber keine neuen Vorteile mit sich gebracht. Im folgenden soll nun über die Untersuchungen an Getreidefrüchten berichtet werden.

---

[1] Arbeiten der Landwirtschaftlichen Versuchsstation Limburgerhof.

Secale cereale L. (Roggen).

A. Sorte: v. Lochows Petkuser Normalstroh Winterroggen (Hochzucht).

Die Probe stammte aus der Umgebung von Homberg, Bez. Kassel, und wurde im Juli 1940 in gelbreifem Zustande geerntet; die Keimfähigkeit betrug 98% nach 3 Tagen.

Im Januar 1941 untersuchte ich 20 Körner der Probe, von denen 120 Schnitte angefertigt wurden. Jeweils die Hälfte, das sind von jedem Korn drei Schnitte, wurde nach einer der zwei genannten Methoden behandelt. Bei den mit Orseillin BB gefärbten Schnitten konnten fast überall Pilzhyphen in größerer Zahl beobachtet werden; nur vereinzelte Schnitte machten eine Ausnahme. Die Hyphen hoben sich deutlich von dem übrigen Gewebe durch intensivere Rotfärbung ab (Abb. 3); ihre Dicke schwankte zwischen 2,3 und 6,6 μ; die dickeren Hyphen waren etwas stärker septiert als die dünneren. Sie durchzogen das Gewebe der Längs- und Querzellenschicht und schienen sich dabei mehr intercellular zu halten, denn innerhalb der Zellen konnten keine Pilzhyphen beobachtet werden. Sehr zahlreich waren Pilzhyphen in Hohlräumen vertreten, die sich durch Loslösen der Fruchtschale von der Samenschale gebildet hatten und vor allem zu beiden Seiten der Raphe stark ausgeprägt in Erscheinung traten.



Abb. 3. Roggen, Längsschnitt aus Korn mit Pilzhyphe (Orseillin BB, *Sartory*sche Lösung). Vergr. 175 mal.

Entgegen den Angaben von *Peklo* und *Niethammer* (4) erwiesen sich die Zellwände und Zellen der Aleuronschicht in allen Fällen als pilzfrei, und auch im Mehlkörper konnten — in Übereinstimmung mit den vorgenannten Autoren — von einer Ausnahme abgesehen, keine Pilzhyphen festgestellt werden. Obwohl *Niethammer* (4) auch im Gewebe des Keimlings Pilzhyphen gesehen zu haben glaubt, fand sich im vorliegenden Material keine Bestätigung dafür. Es liegt vielmehr nahe anzunehmen, daß die Pilze die unverletzte Samenschale nicht zu durchdringen vermögen. Denn einmal konnte ich deutlich sehen, daß einzelne Pilzhyphen durch eine alte Rißstelle in der Samenschale bis weit in den Mehlkörper vorgedrungen waren. Aber auch hier konnte kein Befall der Aleuronzellen beobachtet werden. Das Korn war gänzlich normal entwickelt und wies auch äußerlich keine Zeichen von Pilzbefall auf.

Fruktifikationsorgane der Pilze wurden innerhalb der pflanzlichen Gewebe nicht beobachtet.

In den übrigen mit Oxaminblau 4 R gefärbten 60 Schnitten, die in Hohlschliffen kultiviert wurden, entwickelten sich in den meisten Fällen innerhalb weniger Tage zahlreiche Pilzhyphen, deren Ursprung aus den im Innern der Schale liegenden Hyphen unter dem Mikroskop deutlich beobachtet werden konnte; aber in nur wenigen Präparaten fand nach etwa 8 Tagen Konidienbildung statt. Dreimal wurde *Hormodendron*, allem Anschein nach *Hormodendron herbarum*, öfter *Alternaria* festgestellt (Tabelle II). *Niethammer* (4) bestimmte die von ihr isolierte *Alternaria* als *A. humicola*; im vorliegenden Falle aber war der Pilz eher als *Alternaria secalis* anzusprechen. *Hormodendron* und *Alternaria* fanden sich hin und wieder im gleichen Korn.

Tabelle II. Isolierung von Pilzen aus Getreidefrüchten.
Anzahl der Isolierungen.

	Secale cereale	*Triticum aestivum*	*Hordeum vulgare*	*Avena sativa*
Alternaria tenuis		4 (15)	1 (8)	
Alternaria secalis	6 (20)			
Hormodendron herbarum	3 (20)			
Hormodendron chlorinum var. nigrovirens				1 (8)
Cephalosporium accremonium		1 (15)		1 (8)
Fusarium graminearum			2 (8)	
Unbestimmbare Pilze	9 (20)	7 (15)	2 (8)	5 (8)

In ( ) = aus Anzahl der Früchte.

B. Sorte: Heßdorfer Johannisroggen.

Die Proben stammten vom Versuchsfeld des Instituts für Pflanzenbau in Göttingen. Die erste der Proben wurde in grünreifem Zustand am 6. Juli 1939 geerntet, die zweite Probe war bei der Ernte am 20. Juli 1939 gelbreif. Die Untersuchung beider Proben erfolgte im April 1941.

Die Untersuchung der grünreif geernteten Probe brachte gegenüber A. nichts Neues. Pilzhyphen waren in ähnlichem Umfange vorhanden, und es war auch nirgends zu beobachten, daß Pilze in die Aleuronschicht oder den Keimling eindrangen. In Hohlschliffkulturen unterblieb überall das Pilzwachstum, obgleich die Bedingungen gegen früher nicht geändert worden waren; es mußte daher angenommen werden, daß die Hyphen bereits tot waren.

Die gelbreif geerntete Probe wies Pilzhyphen in der gleichen Art wie A. auf; in Kulturversuchen erfolgte aber auch hier kein Wachstum mehr.

C. Sorte: Nordost.

Die Proben stammten ebenfalls vom Versuchsfeld des Instituts für Pflanzenbau in Göttingen. Eine grünreife Probe wurde am 6. Juli 1939

genommen, während die gelbreife Probe am 20. Juli 1939 geerntet wurde. Die Untersuchung beider Proben fand im April 1941 statt.

Neue Befunde waren nicht zu verzeichnen; die Ergebnisse der Proben A. und B. fanden hinsichtlich des Vorkommens von Pilzhyphen ihre Bestätigung. Wachstum der Hyphen fand weder in den Hohlschliffkulturen der grünreif geernteten Probe, noch in denen der gelbreif geernteten statt. Danach muß man annehmen, daß die Pilzhyphen bei längerer Lagerung absterben.

Triticum aestivum L. (Weizen).

Zur Untersuchung gelangte nur eine Probe eines Sommerweizens der Ernte 1940 aus der Gegend von Homberg, Bez. Kassel, die in gelbreifem Zustand geerntet wurde. Die Untersuchung erfolgte im Mai 1941.

Bei mikroskopischer Betrachtung der mit Orseillin BB gefärbten Schnitte bot sich ein ganz ähnliches Bild wie bei Roggen: Pilzhyphen fanden sich in der Fruchtschale intercellular wachsend, vornehmlich aber in den Hohlräumen zwischen Frucht- und Samenschale; in größerer Menge waren sie wieder in den großen Höhlungen seitlich der Raphe zu beobachten. Septierung und Größenverhältnisse entsprachen denen der bei Roggen beschriebenen Pilzhyphen. Aleuronschicht und Mehlkörper sowie das Gewebe des Keimlings erwiesen sich als pilzfrei.

Die Färbung des anderen Teiles der Schnitte mit Oxaminblau 4 R und deren Kultur in Hohlschliffen erbrachte mehrmals das Wachstum von *Alternaria tenuis Nees* und einmal von *Cephalosporium acremonium Corda*. In anderen Präparaten entwickelten sich weißliche bis graue Pilzlager, ohne jedoch irgendwelche Fruchtkörper zu bilden (Tabelle II). Die von *Niethammer* (4) erwähnten Arten, *Trichoderma Koningi*, *Mucor hiemalis*, wurden hier nicht isoliert.

Hordeum vulgare L. (Gerste).

A. Sorte: Dr. Mausbergs Wintergerste.

Auf dem Versuchsfeld des Instituts für Pflanzenbau in Göttingen wurden zwei Proben, eine am 6. Juli 1939 in grünreifem Zustand, die andere gelbreif am 20. Juli 1939 geerntet. Die Untersuchung fand im April 1941 statt.

Durch kurzes Einquellen in Leitungswasser lockerten sich die Spelzen etwas, so daß sie leicht entfernt werden konnten; die Weiterbehandlung der Körner erfolgte wie eingangs beschrieben. Nach den bei den Versuchen mit Roggen gemachten Erfahrungen konnte auf eine Färbung der Schnitte mit Oxaminblau 4 R und deren Kultur in Hohlschliffen verzichtet werden; vorgenommene Stichproben bestätigten dies. — Die mikroskopische Untersuchung der mit Orseillin BB gefärbten Schnitte ergab wieder Pilzhyphen in den Geweben der Frucht-

schale, doch in weit geringerem Umfange als bei Roggen und Weizen. Man geht wohl nicht fehl, wenn man hier das geringere Vorkommen vôn Pilzhyphen auf einen gewissen Schutz zurückführt, den wohl die fest anliegende Spelze dem Korn bietet. Die beobachteten Hyphen waren ziemlich stark septiert, zwischen 2 und 4 μ dick und verliefen intercellular; intracellulares Vorkommen von Hyphen wurde nicht beobachtet. Die hier mehrschichtige Aleuronschicht wies in keinem Falle Pilzhyphen in den Zellen oder Zellwänden auf; ebenso waren der Mehlkörper und der Keimling pilzfrei. Die grünreif geerntete Probe unterschied sich nicht von der gelbreif geernteten.

B. Sorte: Friedrichswerther Berg-Wintergerste.

Die Proben wurden wieder in grünreifem Zustande am 6. Juli 1939 und in gelbreifem Zustand am 20. Juli 1939 auf dem Versuchsfeld des Instituts für Pflanzenbau in Göttingen geerntet.

Die mikroskopische Untersuchung beider Proben ergab keine neuen Befunde. Hervorzuheben ist nur, daß auch bei diesen Proben in der Aleuronschicht, im Mehlkörper und im Gewebe des Keimlings keine Pilzhyphen beobachtet wurden.

C. Sorte: Peragis Wintergerste.

Wieder wurden zwei Proben — eine grünreife am 6. Juli 1939 und eine gelbreife am 20. Juli 1939 — auf dem Versuchsfeld des Instituts für Pflanzenbau in Göttingen geerntet.

Beide Proben unterschieden sich hinsichtlich des Pilzbefalles nur insoweit voneinander, als die gelbreif entnommene Probe etwas stärkeren Befall aufwies. Neue Beobachtungen wurden gegenüber A. und B. sonst nicht gemacht.

D. Sorte: Unbekannt; Sommergerste.

Die Probe wurde von todreifem Material der Ernte 1940 entnommen und stammte aus der Gegend um Homberg, Bez. Kassel.

Die mikroskopische Untersuchung der mit Orseillin BB gefärbten Schnitte ergab, daß Pilzhyphen hier in den Geweben der Schalen häufiger vorkommen als in den vorhergehenden Proben, wohl eine Auswirkung der Witterungsverhältnisse. Aber auch hier blieben die Hyphen auf die Gewebe der Fruchtschale beschränkt, wo sie sich intercellular ausbreiteten. In den Aleuronzellen wurden keine Pilzhyphen beobachtet, ebenso nicht in Geweben des Mehlkörpers und des Keimlings.

Aus Schnitten, die mit Oxaminblau 4 R gefärbt wurden und Pilzhyphen im Schalengewebe führten, entwickelte sich in einigen Hohlschliffkulturen *Alternaria tenuis Nees*, in anderen Kulturen gelangten *Fusarium graminearum* zur Entwicklung (Tabelle I), ferner noch ein

unbestimmbarer Pilz. Dagegen fehlte in allen Kulturen *Hormodendron*. Einige Hohlschliffkulturen der älteren Proben A.—C. ergaben keine Pilzentwicklung, was mit den Erfahrungen bei Roggen übereinstimmt.

Avena sativa L. (Hafer).

Sorte: von Lochows Petkuser Gelbhafer Flämings-Gold

Zur Untersuchung gelangte nur diese eine Probe (Hochzucht aus der Umgebung von Homberg, Bez. Kassel) aus dem Erntejahr 1940, die auf dem Felde von gänzlich ausgereiftem Hafer entnommen wurde. Die Verarbeitung des Materials erfolgte im Mai 1941.

Die Körner wurden zunächst zwei- bis dreimal gründlich in Leitungswasser gewaschen. Die mikroskopische Untersuchung des Waschwassers ließ zahlreiche Konidien von *Fusarium* und *Alternaria* erkennen. — Dann folgte ein 2—3 Minuten dauerndes Bad in 0,2 %iger $HgCl_2$-Lösung; darauf wurden die Körner zweimal in dest. Wasser nachgespült, entspelzt und nochmals 2—3 Min. lang in 0,2 %iger $HgCl_2$-Lösung gebadet, alsdann in sterilem dest. Wasser einige Minuten nachgespült; während der Zeit wurde das sterile Wasser zweimal gewechselt. Dann wurden die Schnitte in der üblichen Weise angefertigt.



Abb. 4. Hafer, Aufsicht auf die Fruchtschale mit Pilzhyphen (Orseillin BB, *Sartory*sche Lösung). Vergr. 350 mal.

Die mikroskopische Untersuchung der mit Orseillin BB gefärbten Schnitte führte zu ganz entsprechenden Ergebnissen wie bei Roggen und Weizen. Hyphen waren in allen Schnitten zu erkennen (Abb. 4). Sie durchzogen die Fruchtschale intercellular in größerer Anzahl. Sehr reichlich waren sie auch in Hohlräumen zu finden, die von Frucht- und Samenschale gebildet wurden. In den Zellen der Aleuronschicht und deren Wänden wurden niemals Pilzhyphen beobachtet, ebenso nicht im Gewebe des Mehlkörpers und des Keimlings. — Die Hyphen waren reich septiert, und Messungen ergaben Dicken von 2,3—5,6 μ.

In Hohlschliffkulturen der mit Oxaminblau 4 R gefärbten Schnitte entwickelten sich *Hormodendron chlorinum var. nigrovirens (Fresen) Sacc.* und *Cephalosporium acremonium* in je einem Fall. Entsprechende Schnitte, die auf $^1/_2$ Bierwürze-Agar ausgelegt wurden, lieferten die gleichen Ergebnisse. In anderen Kulturen zeigte sich reiches Mycel, ohne daß Fruchtkörper gebildet wurden (Tabelle II).

Lolium temulentum L. (Taumellolch).

Das untersuchte Material stammte aus dem Botanischen Garten in Göttingen.

In den mit Orseillin BB gefärbten Schnitten der Samen hob sich die Dauermycelschicht des Begleitpilzes *Chaetomium Kunzeanum* deutlich von den übrigen Gewebepartien ab. Der Pilz scheint aber nicht auf das angrenzende Gewebe überzugreifen; er bleibt vielmehr auf die Dauermycelschicht beschränkt. Nach *Günnewig* sollen auch Hyphen des Pilzes im Gewebe des Embryo vorkommen. Jedenfalls ist die Ausbreitung des Pilzes eine ganz andere als bei den oben beschriebenen Fällen; gerade von diesem Gesichtspunkt aus war *Lolium* als Vergleichsmaterial willkommen.

Viscum album L. (Mistel).

Zur Untersuchung standen 21 reife Früchte aus der Gegend von Treysa in Hessen zur Verfügung. Die Ernte erfolgte in den ersten Tagen des Januar 1940, so daß die Früchte schon stärkeren Frost überstanden hatten.

Nachdem die Früchte gründlich in frischem Leitungswasser gewaschen waren, wurden sie zur äußerlichen Sterilisation 2—3 Minuten lang in 0,2%ige Lösung von $HgCl_2$ gelegt und dann zweimal mit sterilem destillierten Wasser abgespült. — Die Entnahme von Proben geschah mittels ausgeglühter, noch heißer Nadel, mit der die Schale aufgeritzt und zur Seite geklappt wurde. So ließ sich das Fruchtfleisch mit dem darin eingebetteten Kern leicht und schnell mit der nochmals abgeflammten Nadel herausheben und in Reagensröhrchen mit Bohnenbrühe und Bohnenbrühe-Agar einbringen.

Im ersten Versuch erschienen nach wenigen Tagen auf zwei Proben kleine Lager von *Penicillium glaucum,* die aber als Fremdinfektionen gedeutet werden mußten (vgl. S. 22); im zweiten Versuch, der in gleicher Weise angelegt worden war, blieben sämtliche Proben steril (Tabelle IV, S. 22). Kontrollproben mit sterilisierten Schalestücken blieben ebenfalls steril, während in Reagensröhrchen mit ungereinigten Schaleteilen kräftiges Bakterien- und Pilzwachstum zu beobachten war.

Aus beiden Versuchen darf jedoch nicht ohne weiteres geschlossen werden, daß sich keine Mikroorganismen in den Mistelfrüchten befunden hätten. Man muß vielmehr in Betracht ziehen, daß die Früchte, bevor sie geerntet wurden, Temperaturen bis zu — 20° C ausgesetzt waren und der Einwand berechtigt scheint, die Mikroorganismen könnten durch die Kälte so gelitten haben, daß sie nicht mehr zu weiterem Wachstum befähigt gewesen wären. Für Pilzhyphen könnte dies wohl zutreffen, kaum aber für Pilzsporen und andere Dauerzustände von Pilzen und für Bakterien. Da aber bei mikroskopischer Untersuchung auch keine Pilzhyphen im Fruchtfleisch zu sehen waren, so kann doch angenommen werden, daß sich keine Mikroorganismen im Innern der Mistelfrüchte befanden.

Ribes Uva-crispa L. (Stachelbeere).

Aus dem Garten des Instituts für Mikrobiologie in Göttingen stand umfangreicheres Material von Früchten verschiedenen Reifegrades zur Verfügung. Stets wurden nur durchaus gesund aussehende Früchte eingeerntet. Zunächst wurde der Kelchrest von den Früchten entfernt und diese gut in Leitungswasser abgewaschen; vor ihrer Öffnung wurden die Früchte mit einem in 70%igen Alkohol getauchten Wattebausch einige Male gründlich abgerieben, dann kurz abgeflammt. Mit in Alkohol und Flamme sterilisiertem Skalpell wurde die Schale zur Hälfte abgeschält, das Skalpell wieder in Alkohol und Flamme sterilisiert und damit die Frucht gekappt. Mit nochmals abgeflammtem Skalpell wurden dann schnell einige Proben aus dem Innern der Früchte entnommen und verschiedene Reagensröhrchen mit Nährböden damit beimpft. — Bei reifen Früchten wurde die Öffnungsweise insofern abgeändert, als sie nicht gekappt wurden; mit dem sterilen Skalpell wurden vielmehr vier Schnitte ziehend vom Kelchrest zum Stielansatz geführt, so daß sich durch den Druck von innen heraus ein nach beiden Seiten spitz zulaufendes Stück abhob und das Messer vor der Probenahme gar nicht erst mit dem Fruchtinnern in Berührung kam.

Die Ergebnisse dieser Versuche finden sich in Tabelle III zusammengefaßt. Einige *Bakterien* und *Hefen* konnten aus den Früchten isoliert werden. Bei den Bakterien handelte es sich um farblose, sporenbildende Stäbchen, die Gelatine verflüssigten. Unter den isolierten Hefen befand sich eine runde, die als *Torulopsis albida* bestimmt werden konnte; die andere war länglich und bildete rötlichen Farbstoff: sie gehört wohl der Gattung *Rhodotorula* (nach *Lodder*) an.

Tabelle III. Versuche mit Früchten von *Ribes Uva-crispa.*

Versuch Nr.	Datum	Material	Gesamtzahl Fr	Gesamtzahl Pr	Bakterien	Bakterien %	Hefen	Hefen %	Pilze	Pilze %
1	19. VI. 1939	unreif	12	48	—	0	—	0	—	0
2	22. VI. 1939	„	6	12	—	0	1	8	—	0
3	23. VI. 1939	„	3	6	1	17	—	0	—	0
4	6. VII. 1939	halbreif	16	32	—	0	—	0	—	0
5	7. VII. 1939	„	6	12	1	8	—	0	+	0
6	14. VII. 1939	reif	16	32	—	0	1	3	+	0
7	28. VII. 1939	„	20	20	1	5	—	0	—	0
7a	28. VII. 1939	überreif	6	6	1	17	—	0	+	0
9	1. VIII. 1939	stark überreif	16	32	—	0	1	3	++	0
10	2. VIII. 1939	„ „	8	16	—	0	—	0	+	0
57	23. VI. 1941	unreif	12	24	—	0	—	0	++	0
			121	240	4	1,7	3	1,2	—	0
Auf die Anzahl der Früchte bezogen						3,3		2,5		0

Spalte 4: Fr = Früchte, Pr = Proben, + = Fremdinfektion.

Im ganzen liegen aber die Infektionen zahlenmäßig so niedrig (Tabelle III), daß von einem *regelmäßigen* Vorkommen von Mikroorganismen in gesunden Stachelbeerfrüchten wohl keine Rede sein

kann. Dies schließt jedoch nicht aus, daß gelegentlich durch den Stich saugender Insekten oder ähnliche Ursachen hervorgerufene Infektionen doch vorkommen können (vgl. dazu unten S. 31). Die Angaben von *Romwalter* und von *Király* (36), wonach Stachelbeeren regelmäßig Hefen enthalten sollen, fanden sich nicht bestätigt.

Pyrus communis L. (Birne).

Zwei lagerreife Früchte unbekannter Sortenzugehörigkeit aus der Gegend von Homberg, Bez. Kassel, dienten als Versuchsmaterial. Sie wurden zunächst mit Leitungswasser gereinigt, sodann mit 70%igem Alkohol abgerieben und kurz in der Gasflamme abgeflammt. Mit in Alkohol und Flamme sterilisiertem Skalpell wurden dann Fruchtfleischpartien freigelegt und daraus mit nochmals sterilisiertem Skalpell je Frucht neun Proben entnommen, die in Reagensgläser mit verschiedenen Nährböden gebracht wurden; je Frucht entfielen:

Zwei Proben mit je zwei Impfungen auf Bierwürze-Agar = 4 Impfungen
Zwei Proben mit je zwei Impfungen auf Bierwürze.... = 4 Impfungen
Zwei Proben mit je zwei Impfungen auf Kürbissaft-Agar = 4 Impfungen
Zwei Proben mit je zwei Impfungen auf Bohnenbrühe = 4 Impfungen
Eine Probe mit je zwei Impfungen auf Bohnenbrühe-Gelatine .... = 2 Impfungen
18 Impfungen

Kontrollproben von ungereinigten Schalestücken wurden auf Bierwürze, Kürbissaft-Agar und Bohnenbrühe-Gelatine ausgelegt.

Als Ergebnis des Versuchs (Tabelle IV) konnte festgestellt werden, daß sämtliche Proben aus dem Innern steril blieben und sich auch nach mehreren Wochen noch keine Entwicklung von Mikroorganismen zeigte. Dagegen wiesen die Kontrollproben (ungereinigte Schalenstücke) beträchtliches Pilz- und Bakterienwachstum auf.

Tabelle IV. Versuche mit verschiedenen Früchten.

Versuch Nr.	Datum	Früchte von	Gesamtzahl Fr	Gesamtzahl Pr	Bakterien	Bakterien %	Hefen	Hefen %	Pilze	Pilze %
8	28. VII. 1939	*Prunus cerasus*, reif	20	40	1	2,5	3	7,5	++	0
14	23. XI. 1939	*Pyrus communis*, reif	2	18	—	0	—	0	—	0
23	8. I. 1940	*Viscum album*, reif	9	9	—	0	—	0	++	0
24	10. I. 1940	„ „ „	12	12	—	0	—	0	—	0
26	18. I. 1940	*Vicia faba*, Samen reif ..	6	6	—	0	—	0	—	0
27	1. II. 1940	„ „ „ „ ..	10	20	—	0	—	0	—	0
41	28. X. 1940	*Crataegus oxyacantha*, reif	12	12	—	0	—	0	4	33

Malus silvestris Mill. (Apfel).

Oft finden sich in äußerlich ganz gesund aussehenden Äpfeln vollständig verpilzte Kerngehäuse. Bei frisch geernteten oder erst kurze

Zeit gelagerten Früchten ist dieser Pilzbefall auf die Innenseiten des Kerngehäuses und die Kerne beschränkt, während das unmittelbar angrenze Fruchtfleisch keine Spuren eines Pilzbefalles zeigt. Bei ungünstiger Lagerung der Äpfel soll aber der Pilz auch auf das Fruchtfleisch übergehen können, so daß solche Äpfel von innen heraus zu faulen beginnen.

Osterwalder beschrieb diese Kernhausfäule und benannte den Pilz, der sie verursachen sollte, *Fusarium putrefaciens*. *Wollenweber* und *Reinking* machten eine Anzahl anderer *Fusarium*-Arten, wie *Fus. avenaceum* (= *Fus. herbarum* = *Fus. putrefaciens*), *Fus. latericium*, *Fus. oxysporum*, *var. aurantiacum* und *Fus. lactis* für die Entstehung dieser Fäule verantwortlich. Die Infektion soll während der Blütezeit erfolgen, und am meisten gefährdet seien Sorten mit lange offenbleibender oder sich gar nicht schließender Kelchröhre, wie u. a. Danziger Kantapfel, Schöner von Boskoop. *Appel* führt *Fus. herbarum* als Erreger an und erwähnt, daß auch die rote Bergamottebirne leicht befallen werde.

Bei eigenen Versuchen konnten *Alternaria tenuis Nees* und *Phyllosticta tirolensis Bubák*. aus verpilzten Kerngehäusen sonst restlos gesund aussehender Äpfel isoliert werden. Das Fruchtfleisch solcher Früchte muß für pilzfrei gehalten werden, da Versuche, den Pilz daraus zu isolieren, stets negativ verliefen. Weiter soll hier auf diese Frage nicht eingegangen werden, es würde zu weit in das pathologische Gebiet hineinführen.

Einige Bemerkungen über das Verhalten von *Alternaria tenuis* auf verschiedenen künstlichen Nährböden seien hier angeschlossen. Auf Bierwürze-Agar bildete der Pilz sehr reichlich Mycel und schritt erst nach 8—12 Wochen, oft auch gar nicht zur Konidienbildung. Auf Zwiebel-Agar (100 ccm H_2O + 20 g zerquetschte Zwiebeln + 1,5 g Agar) übertragen, blieb die Mycelbildung etwas zurück, aber die Konidienbildung trat schon nach 14—21 Tagen ein; die Konidien waren auch zahlreicher vorhanden und größer als bei den vorigen Kulturen. Wird der Pilz aber auf Glycerin-Agar (100 ccm H_2O + 1,2 g Pepton + 0,8 g Fleischextrakt + 3,0 g Glycerin + 1,5 g Agar) übergeimpft, so tritt die Mycelbildung gänzlich zurück; es entsteht dann nur ein dem Substrat fest aufliegendes farbloses Lager ohne Lufthyphen. Dagegen werden aber schon nach 2—3 Tagen sehr zahlreiche und auffallend große Konidien gebildet. Die folgende Gegenüberstellung soll diese Verhältnisse erläutern:

Abmessungen von Konidien aus Kulturen von *Zwiebel-Agar*, 30 Tage alt:

Länge:	24	20	31	30	23	30	23	20	23	26
Breite:	12	10	13	11	14	9	10	10	6	11

von *Glycerin-Agar*, 30 Tage alt:

Länge:	66	59	40	56	33	72	50	50	53	33
Breite	17	16	16	19	15	21	17	16	27	14

Allem Anschein nach wurde der Pilz durch den Glycerin-Nährboden sehr geschädigt, denn aus 14 Tage alten Kulturen auf anderen Nährböden, wie Bierwürze-Agar, übertragene Mycelstücke, wuchsen gewöhnlich nicht mehr an und auch die Konidien keimten dort nur noch in seltenen Fällen aus. Ähnliches Verhalten zeigte *Alternaria* auf Dextrin-Agar (wie Glycerin-Agar, statt dessen aber 1 g Dextrin).

Crataegus oxyacantha L. (Weißdorn).

Das zur Verfügung stehende Material bestand aus 12 reifen, gesund aussehenden Früchten, die im Herbst 1940 am Hainberg (Göttingen) gesammelt wurden. Die Verarbeitung erfolgte noch am selben Tage. Nach äußerlicher Sterilisation der Früchte (Abwaschen mit Leitungswasser, gründliches Abreiben mit 70%igem Alkohol und kurzem Abflammen) wurden mit geglühter, noch heißer Nadel Fruchtfleischproben, teils mit Kernen, aus dem Innern der Früchte entnommen. Die Proben von sechs Früchten wurden auf $^1/_2$ Bierwürze-Agar, die der restlichen sechs Früchte auf Bohnenbrühe abgeimpft.

Nach 6 Tagen trat in vier der beimpften Röhrchen Pilzwachstum auf (Tabelle IV, S. 22). Der Pilz konnte in allen Fällen als *Clasterosporium obovatum* bestimmt werden.

Daß sich bei der Untersuchung eines umfangreicheren Materials ein ähnlich hoher Anteil an pilzbefallenen Früchten ergeben würde, kann mit Sicherheit angenommen werden. Auch kann bei Berücksichtigung des Baues und der Entwicklung der Früchte ein so hoher Prozentsatz an Infektionen nicht sonderlich überraschen. Mikroskopisch war der Pilz allerdings nicht zu finden, so daß kaum mit einer sehr starken Infektion gerechnet werden kann.

Prunus cerasus L. (Kirsche).

Reife Früchte (Sauerkirschen aus dem Garten des Instituts für Mikrobiologie in Göttingen) gelangten zur Untersuchung. Nachdem die Schale durch Abwaschen mit Leitungswasser, mehrmaliges Abreiben mit 70%igem Alkohol und kurzes Abflammen genügend entkeimt war, wurde mit in Alkohol und Flamme sterilisiertem Skalpell um die Mitte der Frucht ein Schnitt gelegt und die Schale heruntergezogen. Von dem darunterliegenden Fruchtfleisch wurden mit frisch in Alkohol und Flamme sterilisiertem Skalpell je Frucht zwei Proben entnommen und damit Reagensröhrchen mit Bohnenbrühe-Agar beimpft (Tabelle IV).

Nach einigen Tagen entwickelten sich in Proben von drei verschiedenen Früchten *Hefen*, in einer Probe ein sporenbildendes Stäbchen und in zwei weiteren Fällen *Penicillium glaucum*. In den Kontrollversuchen, die mit ungereinigten Schalestücken beimpft waren, beobachtete man reiches Pilz- und Bakterienwachstum, während Proben mit gereinigten und sterilisierten Schaleteilen steril blieben. — Bei den beiden Infektionen mit *Penicillium glaucum* dürfte es sich wohl um

unvermeidbare Fremdinfektionen gehandelt haben, da dieser Organismus stets im Laboratorium als Infektion auftrat. Dagegen können das Bakterium und die Hefen, die als Infektionen sonst nie beobachtet wurden, als aus dem Innern der Früchte stammend betrachtet werden. Alle drei Hefen bilden keine Sporen; eine derselben führt rötlichen Farbstoff von carotinoidem Charakter und gehört wohl — nach *Lodder* (19) — zu ***Rhodotorula glutinis.***

Vicia faba L. (Pferdebohne).

Das Material zur Untersuchung bestand aus reifen Samen der Ernte 1939 aus der Umgebung von Homberg, Bez. Kassel. Die Sorte war unbekannt.

Vor der Verarbeitung mußten die Samen über Nacht in dest. Wasser quellen. Am anderen Morgen wurden sie zwischen Fließpapier abgetrocknet und nacheinander $^1/_2$ bis 1 Minute lang in 70%igem Alkohol gelegt und dann der noch anhaftende Alkohol abgebrannt. Mit sterilem Skalpell wurde ein Teil der Schale entfernt. Von den so freigelegten Kotyledonen wurden mit dem noch einmal sterilisierten Skalpell kleine Stückchen in Reagensröhrchen mit Bohnenbrühe bzw. Bohnenbrühe-Agar übertragen; gleichzeitig wurden Kontrollproben mit sterilisierten und ungereinigten Schalestücken angelegt.

Während in beiden Versuchen die Kontrollproben mit ungereinigten Schalestücken Pilz- und Bakterienentwicklung aufwiesen, blieben die Kontrollproben mit sterilisierten Schaleteilen steril. Aber auch in den Proben der eigentlichen Versuche zeigte sich auch nach Wochen noch keinerlei Pilz- oder Bakterienwachstum. Es kann daher angenommen werden, daß sich in den Geweben des vorwiegenden Materials keine lebenden Mikroorganismen befanden (Tabelle IV, S. 22).

Cucurbita Pepo L. (Kürbis).

Die zur Untersuchung gelangten Früchte wurden im Garten des Instituts für Mikrobiologie in Göttingen in den Jahren 1939 und 1940 gezogen. Es handelte sich um vollständig gesund aussehende Kürbisse von 3—34 kg Gewicht, die nach Abernten im Keller gelagert und nach und nach untersucht wurden. Drei vor, in und kurz nach der Blüte geerntete Fruchtknoten wurden sofort untersucht.

Die Entnahme der Proben gestaltete sich folgendermaßen: Zunächst wurde die ganze Frucht unter der Wasserleitung mit Seife und Bürste gereinigt. Nachdem die Schale etwas abgetrocknet war, wurde die Seite der Frucht, an der die Öffnung vorgenommen werden sollte, mehrmals mit 70%igem Alkohol abgerieben und der Alkohol abgebrannt. Auf dieser Seite wurde eine Stelle von etwa 20 cm Durchmesser mit der Gasflamme solange angebraten, bis die äußere Haut aufriß und verkohlte. In der Mitte dieser Stelle wurde nun mit einem geglühten, noch zischend heißen Messer eine runde, etwa 6 cm weite Öffnung in die Fruchtwand geschnitten. Durch dieses Loch wurden möglichst schnell mit einer langen sterilen Pinzette einige größere Stücke von lockerem Fruchtfleisch mit Kernen herausgerissen und in bereitstehenden sterilen Petrischalen aufbewahrt. Daraus erfolgte anschließend die Übertragung der einzelnen Proben auf die

verschiedenen Nährböden. — Um auch Proben von dem festen Fruchtfleisch der Fruchtwand zu erhalten, wurde von einer anderen Stelle, die nochmals mit Alkohol sterilisiert, aber nur kurz abgeflammt wurde, mit dem abermals geglühten und noch heißen Messer ein Stück der Schale entfernt; aus dem darunterliegenden festen Fruchtfleisch wurden einige dicke viereckige Stücke herausgeschnitten und in eine bereitstehende zweite sterile Petrischale gebracht. Aus dem Innern dieser Stücke wurden mit sterilem Skalpell einige Proben entnommen und diese in Reagensröhrchen mit verschiedenen Nährböden übertragen.

Die untersuchten Fruchtknoten wurden in ähnlicher Weise äußerlich sterilisiert wie kleinere Früchte; nachdem sie mit Leitungswasser gesäubert waren, wurden sie für kurze Zeit in 70%igen Alkohol getaucht und abgeflammt. Darauf wurde mit sterilem Skalpell die Schale rundherum abgeschält und mit frisch sterilisiertem Skalpell der Fruchtknoten gekappt. Mit dem nochmals abgeflammten Skalpell wurden dann die Proben aus dem Innern des Fruchtknotens entnommen und in Reagensröhrchen mit Nährböden übertragen.

Die Ergebnisse dieser Versuche sind zahlenmäßig in Tabelle V zusammengefaßt. Daraus geht hervor, daß in sehr großem Umfange

Tabelle V. Versuche mit Früchten von *Cucurbita Pepo.*

Versuch Nr.	Lockeres Fruchtfleisch + Kerne				Festes Fruchtfleisch				Summe aller Proben
	Bakterien	Pilze	steril	zusammen	Bakterien	Pilze	steril	zusammen	
11	9	—	12	21	—	—	6	6	27
12	6	—	5	11	2	—	3	5	16
13	15	—	4	19	—	—	—	—	19
16a	—	—	7	7	—	—	5	5	12
16b	2	—	6	8	—	—	3	3	11
17	8	—	13	21	1	—	2	3	24
18	5	+	10	16	2	+	5	8	24
19	8	—	9	17	3	—	4	7	24
20	9	—	13	22	2	—	6	8	30
21	—	1	20	21	—	—	—	—	21
39	—	—	6	6	—	—	2	2	8
40	3	+	2	6	1	-	1	2	8
42	1	+	14	16	—	—	6	6	22
43	5	—	25	30	—	+	11	12	42
46	1	++	9	12	2	+	5	8	20
47	3	—	14	17	—	—	3	3	20
48	9	—	3	12	—	—	4	4	16
49	4	1+	14	20	1	—	4	5	25
18	88	2	186	282	14	--	70	87	369
	31 %	0,7 %	66 %	100 %	16 %	0 %	81 %	100 %	
36	4	—	—	4	Fruchtknoten vor, während und kurz nach der Blüte.				
37	4	—	1	5					
38	2	—	6	8					
3	10	—	7	17					17
	59 %	0 %	41 %	100 %					386

+ Infektionen, die sehr wahrscheinlich nicht aus dem Material stammen (*Penicillium glaucum*).

Mikroorganismen *in* den Früchten nachgewiesen werden konnten; nur aus 2 von 21 Früchten ließen sich keine Mikroorganismen isolieren, d. h. daß das untersuchte Material zu rund 91% *Bakterien* und *Pilze* im Innern enthielt.

In der Hauptsache waren es Bakterien, die sich im Innern der Kürbisfrüchte vorfanden, und man konnte hier fast von regelmäßigem Vorkommen sprechen; dagegen fanden sich in nur zwei Fällen Pilze. Betreffs der Bakterien decken sich diese Befunde mit denen von *Miehe*.

Aus der Zusammenstellung der Tabelle V geht aber auch hervor, daß sich das lockere Fruchtfleisch im Innern der Frucht anders verhält als das feste Fleisch der Fruchtwand. Während sich in 31% der Proben des ersteren Bakterien entwickelten, trat dies nur in 16% der Proben des letzteren ein. Ein entsprechendes Verhältnis zeigte auch die Umrechnung auf die Anzahl der untersuchten Früchte: nur bei 45% des Materials konnten Bakterien aus dem festen Fruchtfleisch isoliert werden; Pilze fanden sich darin überhaupt nicht. Es handelt sich danach offenbar um ein Vorkommen in den Intercellularen, nicht im Innern der Zellen.

Tabelle VI. Versuche mit Früchten von *Cucurbita Pepo* in zeitlicher Reihenfolge.

Infektionen in % der Proben der jeweiligen Gruppe. % der gesamten Infektionen sind auf die Gesamtzahl der Proben des Versuchs bezogen

Versuch Nr.	Datum der Untersuchung	Fruchtfleisch locker %	Fruchtfleisch fest %	Gesamte Infektionen %	Bemerkungen
21	23. IX. 1939	5	–	5	
11	11. XI. 1939	43	0	33	
12	15. XI. 1939	55	40	50	
13	16. XI. 1939	79	–	79	
16a	1. XII. 1939	0	0	0	
16b	1. XII. 1939	25	0	18	
17	18. XII. 1939	38	33	37	
18	18. XII. 1939	31	20	29	
19	19. XII. 1939	47	43	46	
20	19. XII. 1939	41	25	36	
36	18. IX. 1940	100	–	100	Proben aus dem Innern von Fruchtknoten vor, in und nach der Blüte.
37	5. X. 1940	80	–	80	
38	5. X. 1940	25	–	25	
39	6. X. 1940	0	0	0	Kurz nach der Blüte (Durchmesser 8 cm).
40	6. X. 1040	50	50	50	
42	1. XI. 1940	6	0	4	Unreif geerntet.
43	14. XI. 1940	20	0	12	
46	7. XII. 1940	8	25	15	
47	13. I. 1941	18	0	15	
48	23. I. 1941	75	0	56	
49	30. I. 1941	25	20	24	

Wenn die Mikroorganismen erst während der Zeit der Lagerung im Keller in die Früchte eingewandert wären, so hätte sich daraus eine mit der Zeit sich steigernde Anzahl infizierter Proben ergeben müssen. Ein solche Tendenz ist aber aus der in Tabelle VI gemachten Zusammenstellung nicht zu ersehen. Es muß daher angenommen werden, daß — wie auch *Miehe* folgert — die Kürbisfrucht von vornherein Mikroorganismen enthält.

Die Zählung der Bakterien im Fruchtfleisch liefert wegen ihrer durchaus ungleichmäßigen Verteilung innerhalb der ganzen Frucht Ergebnisse, die nur für die betreffenden Proben Gültigkeit besitzen können, die aber keinesfalls auf die ganze Frucht umgerechnet werden dürfen. Selbst durchgeführte Zählungsversuche führten zu so widersprechenden Ergebnissen, daß hier auf ihre Wiedergabe verzichtet werden kann.

Einer der isolierten Pilze wurde als *Hormodendron olivaceum (Corda) Bonard* bestimmt. Er wächst gut auf Würze- und Kürbissaft-Agar, wo er auch schnell fruktifiziert; dagegen ist sein Wachstum auf *Czapek*-Agar wesentlich langsamer. Der andere aus Kürbis isolierte Pilz konnte als *Acrostalagmus cinnabarinus (Corda)* bestimmt werden. Auf Würze-Agar wächst er gut und bildet auf der Oberfläche etwas wollige, ziegelrote, mit weißen Lufthyphen durchsetzte Kolonien, während die Kulturen auf Kürbissaft-Nährboden eine samtartige und kompaktere Oberfläche ohne Lufthyphen aufwiesen. Auf *Czapek*-Agar breitet sich der Pilz verhältnismäßig schnell aus, indem er nur ein ganz dünnes, lockeres, oben etwas wolliges Lager bildet.

Die meisten der isolierten Bakterien waren sporenbildende Stäbchen, die die Eigenschaften von *Bac. vulgatus (mesentericus) (Migula) Flügge*, besaßen; doch erweckten junge, lebende Zellen bei Betrachtung im Dunkelfeld den Anschein, als seien sie nur mit zwei Geißeln ausgerüstet. Solange aber die Frage der Begeißelung noch nicht endgültig geklärt ist, kann diesem Merkmal keine entscheidende Bedeutung beigemessen werden. — Nach *Burgwitz* soll dieses Bakterium der Erreger der Stempelfäule bei weiblichen Blüten von *Cucurbita Pepo* sein, die auch zuweilen auf den Fruchtknoten übergriffe. Da aber beobachtet werden konnte, daß in den meisten Fällen die fleischigen Stempel der Kürbisblüten durch Fäulnis zugrunde gingen, so läßt sich wohl das häufige Vorkommen dieses Bakteriums im Innern der Kürbisfrucht als eine gewissermaßen unterdrückte Erkrankung der Frucht auffassen; dafür spricht auch, daß *Bac. vulgatus* sich im Innern der Frucht nicht wesentlich zu vermehren scheint, was auch aus Tabelle V zu entnehmen ist. In dieser Hinsicht wären Untersuchungen über die Abhängigkeit des Vorkommens von *Bac. vulgatus* in Kürbisfrüchten von dem Verlauf der Sommerwitterung recht aufschlußreich, denn es wäre denkbar, daß in Jahren

mit trockenen Sommern, in denen die Stempel der weiblichen Blüten meist eintrocknen können, auch das Vorkommen der Bakterien in den Früchten geringer wäre.

In zwei weiteren Fällen wurden gelbe Bakterien isoliert. Sie entwickelten sich gut auf Kürbissaft-Agar, gelangten aber auf Glycerin-Agar in kurzer Zeit zu noch größerer Massenentwicklung. Die in dicker Schicht liegenden Kulturen besaßen eine glatte und fettig glänzende Oberfläche. Man hätte sie als *Mycobacterium luteum* bestimmen können, doch fehlte ihnen die nach *Haag Mycobacterium* von *Corynebacterium* unterscheidende Eigenschaft, daß ersteres Paraffin als C-Quelle verwerten könne. Er verschwieg allerdings nicht gewisse Beobachtungen, denen zufolge *Corynebacterium* sich doch auf Paraffin entwickelt haben könnte. Er führte dies aber darauf zurück, daß das verwendete Paraffin möglicherweise noch andere flüchtige Stoffe enthalten hätte. Die beiden isolierten Bakterien wurden daher zu *Corynebacterium* gestellt und als *Corynebacterium bruneum (Schröher) Kinhalt* u. *Berend* (*Lehmann-Neumann*, II, S. 708) bestimmt. Bei Färbung mit Methylenblau und Carbol-Gentiana-Violett bemerkte man im Innern der Zellen 2—3 besonders stark angefärbte Körnchen (Abb. 5). Nach *Feulgen* gefärbt zeigten die weitaus meisten Zellen diffuse Färbung, und nur ein verschwindend geringer Teil der Zellen wies Körnung auf. Die Deutung der Beobachtung würde jedoch zu weit führen; die Feststellung möge hier genügen.

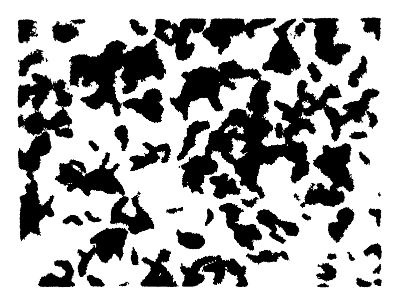


Abb. 5. *Corynebacterium bruneum* aus Kürbis, 3 Wochen alte Kultur auf Glycerin-Agar. Carbol-Gentiana-Violett. Vergr. 990 mal.

Wirkung der einzelnen Nährböden.

Im Hinblick auf die Angaben von *Schanderl* (1, 2) über die besondere Eignung von Bohnenbrühe-Nährböden (welche Meinung jetzt allerdings aufgegeben ist, wie S. 3 gesagt wurde) wäre anschließend die Frage zu prüfen, ob die Wahl bestimmter Nährböden die Versuchsergebnisse entscheidend beeinflußt haben könnte. Wäre dies der Fall, so müßte von dem die Entwicklung der Mikroorganismen besonders begünstigenden Nährboden gefordert werden, daß er im Durchschnitt wesentlich mehr Infektionen aufwiese als andere Nährböden; entsprechend müßte bei einem ungünstigen Nährboden die Durchschnittszahl der Infektionen bedeutend unter dem Mittel der anderen Nährböden liegen. Tabelle VII läßt aber erkennen, daß die am meisten verwendeten Nährböden in

ihren Durchschnittswerten nicht weit auseinanderliegen. Die beiden Bohnenbrühe-Nährböden weisen zum Teil einen geringeren Prozentsatz an Infektionen auf als andere gleichzeitig verwendete Nährböden. Da aber *Schanderl* (1) angibt, daß in Bakteroidenform in pflanzlichen Geweben befindliche Mikroorganismen sich in flüssigem Bohnenbrühe-Nährboden erst zu regelrechten Bakterien regenerieren müßten, ehe sie auf festen Nährböden abgeimpft werden könnten, so blieb die Frage offen, ob nicht vielleicht steril erscheinende Proben doch lebende Keime

Tabelle VII. Zahl der Infektionen aus verschiedenartigen Früchten auf verschiedenen Nährböden.
Zusammenstellung aus 35 Versuchen mit zusammen 699 Proben.

Versuch Nr.	Würze		Kürbissaft		Kürbis-Agar		Bohnenbrühe		Bohnenbrühe-Agar	
		%		%		%		%		%
1	—	0								
4	—	0								
6	1	3,1								
7									1	5
7a									1	8,3
8									4	10,0
9	3	9,4								
10	—	0								
11					9	33,0				
12					8	50,0				
13					9	47,2			3	15,7
14	—	0			—	0			—	0
16					1	4,4	—	0	—	0
17					1	4,2	4	16,8	4	16,8
18					3	12,6	2	8,4	2	8,4
19					4	15,4	4	15,4	3	11,6
20					2	6,7	6	20,0	4	13,5
23							—	0	—	0
24							—	0	—	0
26							—	0	—	0
27					—	0	—	0	—	0
28	—	0					—	0		
36	2	50,0							2	50,0
37					2	40,0	3	60,0		
38					—	0	2	25,0		
39					—	0	—	0		
40					2	25,0	2	25,0		
41	1	8,3					3	25,0		
42										4,6
43	3	7,2			1	2,4	2	4,8		
46			3	15,0			3	15,0		
47			1	5,0			2	10,0		
48	3	18,7	3	18,7			—	0	3	18,7
49	2	8,0	2	8,0	1	4,0	1	4,0	1	4,0
57							—	0		
Mittel an 35 Versuchen		8,7		11,8		15,4		10,9		9,3

enthalten könnten. Daher wurden von augenscheinlich steril gebliebenen Proben, die in Bohnenbrühe abgeimpft waren, laufend Proben genommen, indem jeweils einige davon mehrere Wochen hindurch aufbewahrt wurden. Der flüssige Nährboden zeigte stets während dieser Zeit keine Veränderungen, und Versuche, durch Überimpfung von Flüssigkeit aus 5—6 Wochen alten Proben auf festen Nährböden Bakterienwachstum zu erzielen, verliefen alle erfolglos. Es wäre auch merkwürdig, wenn ein Nährmedium, welches die Regeneration von Bakteroiden zu Bakterien ermöglicht, die doch auch nur auf Wachstumsvorgängen beruhen kann, dann das Wachstum bzw. die Vermehrung dieser Bakterien verhinderte. So ist wohl doch der Schluß berechtigt, daß sich die Wahl der Nährböden nicht entscheidend auf die Versuchsergebnisse ausgewirkt haben kann.

II. Das Verhalten der Mikroorganismen gegenüber Früchten und Samen.

Die Isolierung von Mikroorganismen aus dem Innern von Früchten und Samen gab Veranlassung zu Versuchen, die über ihr gegenseitiges Verhalten Aufschluß geben sollten.

Ribes Uva crispa L.

Noch unreife Früchte wurden mit einer Aufschwemmung von aus Stachelbeeren isolierter *Torulopsis albida* in Würze geimpft. Die Beimpfung erfolgte mit einer vorher im Autoklaven sterilisierten Injektionsspritze, die mit $^1/_{10}$ ccm-Teilung versehen und der eine Hohlnadel der Stärke 20 aufgesetzt war. Jede der Früchte bekam 0,1 ccm der Aufschwemmung injiziert. Nur wenige überstanden diesen Eingriff; die meisten fielen schon am folgenden Tage ab. — Die Untersuchung erfolgte durch Proben, die in üblicher Weise steril aus dem Fruchtinnern entnommen und auf Würze bzw. Würze-Agar abgeimpft wurden. War die Hefe noch am Leben, so mußte sie dann auf dem Nährboden wieder zu sichtbarer Entwicklung gelangen.

So fand sich in Früchten, die 2 Tage nach der Impfung geerntet wurden, die Hefe noch überall am Leben (Tabelle VIII). Das erwähnte Abfallen der Früchte verhinderte eine längere Versuchsdauer. In einem zweiten Versuch gelangten zehn Früchte 22 Tage nach der Beimpfung zur Untersuchung; sie hatten sich gänzlich normal weiterentwickelt und standen vor der Reife. Aus drei der zehn geimpften Früchte ließ sich die Hefe wieder isolieren, in den restlichen war sie allem Anschein nach bereits abgestorben.

Prunus cerasus L.

Die Beimpfung der unreifen Früchte erfolgte in gleicher Weise wie bei *Ribes Uva-crispa* mit *Torulopsis albida*. Die Früchte vertrugen die

Tabelle VIII. Versuche über Lebensfähigkeit von *Hefen* in einigen Früchten.

Versuch Nr.	Früchte von	Beimpft am	Beimpft mit	Abgeimpft Anzahl Fr	Abgeimpft Anzahl Pr	Abgeimpft am	Abgeimpft auf	Lebensfähig in Fällen +	Lebensfähig in Fällen —	Nach Tagen
29_1	*Ribes Uva-crispa*, unreif	28. VI. 1940	*Torulopsis albida*	6	6	1. VII. 1940	Mö-KüS KüA	6	--	2
56_1	Wie Nr. 29_1	17. VI. 1941	„ „	5	10	9. VII. 1941	$^1/_2$ W	3	7	22
29_2	*Prunus cerasus*	28. VI. 1940	„ „	5	5	2. VII. 1940	KüS	4	1	4
				6	6	16. VII. 1940	KÜS $^1/_2$W	0	6	18
31	Wie 29_2, fast reif	10. VII. 1940	*Rhodotorula*	10	10	12. VII. 1940	$^1/_2$ W	3	7	2
56_2	Wie 29_2, unreif	17. VI. 1941	*Torolopsis albida*	10	20	23. VI. 1941	$^1/_2$ W	0	20	5
	Wie 29_2, halbreif	21. VII. 1941	„ „	5	12	26. VII. 1941	$^1/_2$ W	6*	6	5
				5	10	31. VII. 1941	$^1/_2$ W	3*	7	10
				2	4	5. VIII. 1941	$^1/_2$ W	0	4	15
	Wie 29_2, halbreif	9. VII. 1941	„ „	10	20	5. VIII. 1941	$^1/_2$ W	(1)	19	27
34	*Solanum lycopersicum* .	3. VIII. 1940	„ „		23	11. IX. 1940	$^1/_2$ W	5	18	40

* In je 3 Früchten.

$^1/_2$ W = Würze $^1/_2$ verdünnt; Mö = Möhrensaft; KüA = Kürbissaft-Agar; KüS = Kürbissaft; ( ) = in der Lebenskraft stark geschwächt.

Beimpfung sehr gut, wenn sie nicht in zu jungem Stadium davon betroffen wurden. Die Stichwunde vernarbte innerhalb einiger Tage, und die Früchte entwickelten sich ohne stärkere Schädigung weiter. Die Hefe schien aber auch hier keine günstigen Lebensbedingungen gefunden zu haben, denn wie aus Tabelle VIII ersichtlich, starb sie im Gewebe der Früchte meist schon nach kurzer Zeit ab. In den meisten Fällen gelang es 15 Tage nach Beimpfung der Früchte nicht mehr, die Hefe daraus zu isolieren. Nur in einem Versuch konnte die Hefe nach 27 Tagen noch aus einer von zehn Früchten wieder herausgezüchtet werden, doch schien sie nach ihrer zunächst langsamen und spärlichen Entwicklung zu urteilen, in ihrer Lebenskraft stark geschwächt zu sein. Eine andere, aus einer Frucht von *Prunus cerasus* isolierte *Rhodotorula* war wohl etwas empfindlicher und konnte nach 2 Tagen nur noch aus wenigen der damit beimpften Früchte wieder herausgezüchtet werden (Tabelle VIII).

Solanum Lycopersicum L. (Tomate).

Aus Früchten, denen in unreifem Zustand je 0,5 ccm der Aufschwemmung von *Torulopsis albida* injiziert wurden, ließ sich die Hefe nach 40 Tagen aus 5 von 23 Proben isolieren (Tabelle VIII). Bei Öffnung der Früchte fielen im Innern des Tomatenmarks weißliche Flocken auf, die den Verdacht erweckten, daß sich die Hefe darin vermehrt haben könnte; die mikroskopische Untersuchung ließ auch Hefezellen in solcher Menge erkennen, daß auf eine starke Vermehrung der Hefe in der Frucht geschlossen werden mußte, und auch die daraus entnommenen Proben lieferten sehr kräftig wachsende Kulturen.

Malus silvestris Mill.

Bald nach der Blüte — Anfang Juli 1940 — wurden junge Früchte mittels Injektionsspritze (Nadelstärke 20) mit einer wässerigen Sporenaufschwemmung von *Phyllosticta tirolensis*, aus Kerngehäuse von Apfel isoliert, beimpft. Die meisten der Früchte überstanden die Beimpfung gut und reiften normal aus; der Einstich vernarbte vollständig und war an reifen Äpfeln nur noch als winziger, etwas rauher Punkt erkennbar. Im Oktober gelangten zehn dieser Früchte zur Untersuchung; vier davon waren schon im Laufe des Juli abgefallen und solange aufbewahrt worden; sie waren daher stark geschrumpft, im übrigen aber noch intakt. Bei ihrer Öffnung waren alle Kerngehäuse verpilzt, jedoch hatte sich der Pilz nicht weiter auf das umliegende Fruchtfleisch ausgebreitet. Die restlichen sechs Früchte wurden Mitte Oktober geerntet; sie waren normal entwickelt, ausgereift und sahen äußerlich vollständig gesund aus. Die Untersuchung wurde einige Tage nach der Ernte vorgenommen. Die Kerngehäuse von zwei Früchten waren nur schwach verpilzt, während die der anderen starke Pilzentwicklung erkennen ließen. Bei allen aber blieb der Pilz auf das Kerngehäuse beschränkt. Versuche, den Pilz aus dem an das Kerngehäuse angrenzenden Fruchtfleisch zu isolieren, verliefen erfolglos. Auch aus Proben, die dem sich von dem weißen Fruchtfleisch als dünne, bräunliche Linie abhebenden Stichkanal entnommen wurden und in den nach der Impfung mit zurückfließender Impfflüssigkeit Pilzsporen hineingeraten sein mußten, ließ sich kein Pilzwachstum erzielen. Ebenfalls waren in mikroskopischen Schnitten, die aus Teilen des Stichkanals hergestellt wurden, keine Pilzhyphen zu erkennen. Der in den Kerngehäusen vorgefundene Pilz ließ sich wieder mit *Phyllosticta tirolensis* identifizieren.

Sechs gesunden, reifen Früchten wurde um Mitte November 1940 eine Konidienaufschwemmung in H_2O von *Phyllosticta tirolensis* injiziert und die Stichwunde mit heißem Paraffin verschlossen. Drei der Äpfel wurden bei $+ 20^0$ C und drei im Kühlen bei wechselnden niedrigen Temperaturen gelagert. Während die drei ersteren schon gegen Ende

Dezember von innen heraus zu faulen begannen, hielten sich die kühl gelagerten Früchte bis Ende Februar und einer davon zeigte erst dann äußerlich erkennbare Fäulniserscheinungen. Aus Proben des faulen Fruchtfleisches ließ sich stets wieder *Phyllosticta tirolensis* isolieren. Der Pilz vermag also Fäulnis bei reifen Lagerfrüchten hervorzurufen, während er heranreifende Früchte nicht schädigt.

Cucurbita Pepo L.

Die hier beschriebenen Versuche knüpfen ebenfalls an Beobachtungen an, die bei den im ersten Teil beschriebenen Versuchen gemacht wurden.

Um das Verhalten von Fruchtfleisch gegenüber Pilzen und Bakterien näher kennenzulernen, wurden aus einer Kürbisfrucht Stücke von festem und lockerem Fruchtfleisch möglichst steril herauspräpariert und in vorher sterilisierte Erlenmeyerkölbchen gebracht. Der Versuch wurde nach folgendem Plan angelegt:

Festes Fruchtfleisch		Lockeres Fruchtfleisch	
roh	bei 100° C in Dampf abgetötet	roh	bei 100° C in Dampf abgetötet
3 Kölbchen	2 Kölbchen	3 Kölbchen	2 Kölbchen
mit Sporen von *Hormodendron olivaceum* beimpft		mit Sporen von *Hormodendron olivaceum* beimpft	
Wachstum:		Wachstum:	
—	++	+	++
3 Kölbchen	2 Kölbchen	3 Kölbchen	2 Kölbchen
mit *Bacillus vulgatus* beimpft		mit *Bacillus vulgatus* beimpft	
Wachstum:		Wachstum:	
—	++	+	++
1 Kölbchen unbeimpft —			1 Kölbchen unbeimpft —

— = nicht; + = spärlich; ++ = gut.

Auf den Stücken von rohem, festem Fruchtfleisch konnte weder Pilz- noch Bakterienwachstum festgestellt werden, und auch auf dem rohen, lockeren Fruchtfleisch war die Entwicklung von Pilz und Bakterium nur recht spärlich, aber doch deutlich. Dagegen bestand zwischen abgetötetem festem und lockerem Fruchtfleisch kein Unterschied mehr; auf beiden Substraten entwickelten sich *Hormodendron olivaceum* und *Bac. vulgatus* gut.

Am 6. Dezember 1940 erhielt eine 2,7 kg schwere Kürbisfrucht eine Einspritzung von 2 ccm einer wässerigen Sporenaufschwemmung von *Hormodendron olivaceum* (Injektionsspritze mit Nadel von Stärke 20).

Die Stichwunde wurde mit heißem Paraffin verschlossen und die Frucht weiter im Keller gelagert. Während dieser Zeit zeigten sich keine äußeren Veränderungen an der Frucht; sie behielt nach wie vor ihr frisches, gesundes Aussehen. Bei ihrer Öffnung konnte aber festgestellt werden, daß der Pilz von der Impfstelle ausgehend große Teile der Innenfläche besiedelt hatte, in das lockere Fruchtfleisch etwas eingedrungen war und auch die meisten Samen mit schwärzlichem Rasen überzog. Auffallenderweise waren alle diese Samen mit langen Wurzeln ausgekeimt, während diese Erscheinung in ungeimpften Früchten erst viel später und auch dann nur sehr vereinzelt beobachtet wurde. Vielleicht ist hier im Hinblick auf die Angaben von *Niethammer* (2, 4) über die Förderung der Samenkeimung durch Pilze, die Vermutung nicht ganz unberechtigt, daß das verfrühte Auskeimen der Samen durch den Pilz verursacht wurde. Das feste Fruchtfleisch der Wandung erwies sich auch hier als pilzfrei.

Diese Beobachtung regte dazu an, den Einfluß von *Hormodendron olivaceum* auf die Keimung von Kürbissamen in besonderen Versuchen zu prüfen.

Als Versuchsgefäße dienten große Petrischalen, die eine Schicht feuchten Sandes enthielten und in Autoklaven bei + 120° C sterilisiert wurden. Das Samenmaterial stammte aus einer hiesigen Gärtnerei. — Um den Einfluß etwa in der Samenschale anwesender Hemmungsstoffe auszuschalten, mußte diese entfernt werden, zumal auch die Keimung der Samen, denen die Samenschale belassen war, so unregelmäßig verlief, daß keine brauchbaren Werte zu erhalten waren. Zu diesem Zwecke mußten die Samen über Nacht in Leitungswasser quellen; am nächsten Morgen wurden sie geschält und in 0,25%iger Uspulun-Universallösung[1] gelegt, worin sie 1 Stunde lang belassen wurden. Anschließend wurden die Samen in sterilem, destilliertem Wasser in vier Stufen, jeweils 5, 15, 30 und 60 Minuten nachgespült. Hieran schloß sich die gesonderte Behandlung der einzelnen Gruppen an. Die erste Gruppe gelangte ohne weitere Behandlung in ihre Versuchsgefäße; die zweite Gruppe erhielt zusätzlich ein halbstündiges Bad in unverbrauchter Nährlösung ($^1/_2$ Würze). Gruppe 3 wurde mit Sporen von *Hormodendron olivaceum Stamm 3* beimpft und Gruppe 4 wurde eine halbe Stunde lang (2) in verbrauchter Kulturflüssigkeit, auf der *Hormodendron olivaceum Stamm 3* 3 Monate hindurch gewachsen war, gebadet. Jede Gruppe bestand aus 25 Samen, da die Petrischalen für eine größere Anzahl nicht genügend Raum boten. Alle Versuchsgefäße wurden in einem dunklen Raum bei + 20° C aufgestellt.

Nach 7 Tagen war die Keimung der Samen so weit fortgeschritten, daß eine Beurteilung möglich war. Die Entwicklung war bei Gruppe 3 am weitesten voraus; ihr folgten der Reihe nach Gruppe 4, 2 und 1. Ein zweiter Versuch wurde in der gleichen Weise, aber mit einer Parallelen angelegt. Die Auswertung des Versuchs erfolgte nach 7 Tagen durch

[1] Arbeiten der Landwirtschaftlichen Versuchsstation Limburgerhof.

Auszählen und Einreihen der Keimlinge nach deren Größe in vier verschiedene Entwicklungsstadien, wobei IV das am weitesten vorgeschrittene Stadium darstellt. Dabei ergab sich das gleiche Bild wie im vorhergehenden Versuch. Die, wenn auch nicht sehr starke, die Samenentwicklung fördernde Wirkung des Pilzes und der verbrauchten Kulturflüssigkeit trat wieder hervor (Tabelle IX), insbesondere bei Gruppe 3 und Stadium IV, also bei den mit Sporen geimpften Samen. Im dritten, in dieser Weise durchgeführten Versuch, bei dem Sporen von *Hormodendron olivaceum Stamm 5* und dessen nur 14 Tage alte Kulturflüssigkeit Verwendung fanden, konnte nach der gleichen Zeit eine Förderung der Keimung durch den Pilz und seine verbrauchte Kulturflüssigkeit nicht beobachtet werden, was möglicherweise auf die Verwendung eines anderen Stammes des Pilzes zurückzuführen ist.

Tabelle IX. Beeinflussung der Keimung von Samen von *Cucurbita pepo* durch *Hormodendron olivaceum St. 3* und dessen verbrauchte Nährlösung.

Je Schale 25 Kerne.

Schale Nr.		Entwicklungsstadium I		II		III		IV	
			%		%		%		%
1	a	16	64	3	12	4	16	2	8
	b	20	80	2	8	3	12	—	0
2	a	18	72	2	8	2	8	3	12
	b	19	76	4	16	2	8	—	0
3	a	17	68	1	4	2	8	5	20
	b	18	72	1	4	3	12	3	12
4	a	16	64	7	28	1	4	1	4
	b	17	68	1	4	3	12	4	16

Schale Nr. 1: nicht zusätzlich weiterbehandelt; Schale Nr. 2: + unverbrauchte Nährlösung (Würze); Schale Nr. 3: + mit Sporen von Hormodendron besät; Schale Nr. 4: + verbrauchte, 3 Monate alte Nährlösung von *Hormodendron olivaceum St. 3.*

Auch mit Gelbhafer (von Lochows Flämingsgold) der Ernte 1940 und dem daraus isolierten *Hormodendron chlorinum var. nigrovirens* und dessen 14 Tage alter Kulturflüssigkeit wurde ein solcher Versuch angelegt. Es zeigte sich, daß der Pilz und seine Kulturflüssigkeit die Keimung des Hafers in keiner Richtung zu beeinflussen vermochten.

Besprechung der Ergebnisse.

Wenn sich die vorliegenden Untersuchungen auch nur auf eine verhältnismäßig geringe Anzahl von Samen von Früchten nur weniger Pflanzenarten beschränkten, so zeigten sie doch, daß sich daraus ver-

schiedene Mikroorganismen isolieren lassen (Tabelle X) und daß, wie die unter jedem Pflanzennamen in ( ) beigefügten Zahlen zeigen, das Vorkommen häufig als regelmäßige oder fast regelmäßige Erscheinung angesehen werden muß. Es kann wohl auch kein Zweifel darüber bestehen, daß sich bei weiteren Untersuchungen unter Einbeziehung noch umfangreicheren Materials noch weitere Pilz-, Hefe- und Bakterienarten aus Früchten und Samen isolieren lassen, worauf auch verschiedene Literaturangaben hinweisen. Von den hier isolierten Mikroorganismen fanden sich aber die jeweiligen Arten meist so unregelmäßig und in so geringem Prozentsatz in den Früchten vor, daß sie nicht als Symbionten angesprochen werden konnten, wie es einige Autoren tun zu müssen glaubten; und auch dort, wo nahezu regelmäßiges Vorkommen beobachtet wurde, wäre eine solche Annahme durch nichts gerechtfertigt.

Diese Ansicht kann auf mannigfache Weise begründet werden, ohne daß hier eine eingehende Analyse der einzelnen Erscheinungen vorgenommen werden soll.

1. Einmal finden sich in Früchten von Pflanzen gleicher Art und Herkunft verschiedenartige Mikroorganismen. Bei den von mir untersuchten Fällen fand sich nur beim Kürbis eine Art, *B. vulgatus*, durchaus vorherrschend und in 91 % der untersuchten Früchte, also auch nicht in allen Fällen. Dieses Vorkommen ist jedoch nach den unter 4. vorgebrachten Gesichtspunkten zu deuten. Im übrigen zeigte sich bei den aus der Gegend von Göttingen und Kassel untersuchten Wacholderbeeren ein Pilz, *Hormodendron chlorinum var. nigrovirens*, als verhältnismäßig vorherrschend und in 20 % der untersuchten Beeren vorhanden. Aber es fand sich auch ein anderer Pilz, und Beeren wieder anderer Herkunft ergaben den erwähnten Pilz nicht, sondern andere Arten: eine kroatische Probe zeigte sogar überhaupt keine Infektion. Endlich zeigt auch das 100 %ige Vorhandensein von Pilzen in Getreidefrüchten ein durchaus wechselndes Bild in der Artenzusammensetzung.

2. Zweitens handelt es sich in gewissen Fällen zweifellos um Infektionen von Pflanzengewebe, die man nicht als voll lebensfähig ansehen kann. Das trifft insbesondere für die *Gramineen*-Früchte zu, in denen der Pilz nur in den Geweben der Fruchtschale vorkommt, das eigentliche Samengewebe, Aleuronzellen, Zellen des Keimlings und des Mehlkörpers aber streng meidet. Die Infektion dürfte auf eine ähnliche Stufe zu stellen sein wie das bekannte Auftreten von Schwärzepilzen auf Getreide. Sie können als mehr oder weniger zufällige Ansiedlungen aufgefaßt werden. Der Umstand, daß die Pilze, wie oben erwähnt, bei älterem Saatgut augenscheinlich abgestorben waren, dürfte weiterhin darauf hinweisen, daß die Pilze in dem absterbenden Gewebe keine zusagenden Bedingungen mehr finden, was zweifellos ebenfalls gegen die Auffassung eines engeren symbiontischen Verhältnisses spricht.

Tabelle X. Aus normalen Früchten und Samen isolierte Mikroorganismen.

Frucht- (Samen-) Art	Isolierte Mikroorganismen	
	von mir	nach Angaben anderer Autoren[1]
Juniperus communis (0 bis 93 %)	*Hormodendron chlorinum var. nigrovirens* ○ *Alternaria (tenus)* ∼	*Aspergillus (?) (Nestler)*
Secale cereale (100 %; mikroskopisch festgestellt)	*Hormodendron (herbarum)* ∼ *Alternaria secalis* ○	*Alternaria humicola* *Cladosporium herbarum* *Penicillium expansum* *Fusarium discolar* *Mucor hiemalis* *Rhizopus lycopersici* *Torula velutina* } *(Niethammer)* (2, 4, 5, 6)
Triticum vulgare (100 %; mikroskopisch festgestellt)	*Alternaria tenuis* ○ *Cephalosporium acremonium* ∼	*Trichoderma Koningi* *Mucor hiemalis* *Penicillium bicolor* } *(Niethammer)* (2, 4, 5, 6)
Hordeum vulgare (100 %; mikroskopisch festgestellt)	*Alternaria tenuis* ○ *Fusarium graminearum* ∼	*Alternaria humicola (Niethammer)*
Avena sativa	*Hormodendron chlorinum var. nigrovirens* ∼ *Cephalosporium acremonium* ∼	Keine Angaben
Viscum album (0 %)		Keine Angaben
Ribes Uva-crispa (5,8 %)	*Torulopsis albida* ∼ *Rhodotorula* ∼, *Bakterien* ∼	*Torula (Romwalter d. Ä. u. v. Király)*
Pirus communis (0 %)		*Penicillium expansum (Niethammer)* *Cladosporium herbarum* *Mucor hiemalis Hefen* *Bac. Piri (Cauda)* *Bakterien (Schanderl)*
Malus silvestris a) Kerngehäuse (nur infiziertes Material untersucht)	*Alternaria tenuis* ∼ *Phyllosticta tirolensis* ∼	*Mucor racemosus* „ *piriformis* „ *spinosus* *Rhizopus nigricans* *Dematium pullulans* *Torulopsis* } *(Niethammer)*

[1] Vgl. Anm. S. 2.

Tabelle X (Fortsetzung).

Frucht- (Samen-) Art	Isolierte Mikroorganismen	
	von mir	nach Angaben anderer Autoren
b) **Fruchtfleich** (0 %)		*Cladosporium herbarum* *Dematium pullulans* *Penicillium expansum* „ *glabrum* „ *luteum* „ *notatum* „ *purpurogenum* *Botrytis cinera* *Fusarium solani* „ *lateritium* *Mucor hiemalis* *Rhizopus nigricans* } *(Niethummer)*
Crataegus oxyacantha (33 %)	*Clasterosporium oboratum* ○	Keine Angaben
Prunus cerasus (10 %)	*Rhodotorula glutinis* ~ *Bakterien* ~	*Botrytis cinerea* *Cladosporium herbarum* } *(Niethammer)*
Vicia faba (0 %)		Keine Angaben
Cucurbita pepo (91 %)	*Bac. vulgatus* × *Corynebacterium bruneum* ~ *Hormodendron olivaceum* ~ *Acrostalagmus cinnabarinus* ~	*Bakterien (Miehe)*

In ( ) unter dem Pflanzennamen die Häufigkeit der festgestellten Infektion.

Zeichen: — = nichts gefunden; ~ = vereinzelt gefunden; ○ = oft gefunden; × = fast regelmäßig gefunden; ⊗ = regelmäßig gefunden.

3. Drittens zeigt die Tatsache, daß es möglich ist, z. B. *Hefen* in Früchte künstlich einzuführen, wo sie eine gewisse Zeit am Leben bleiben können, daß durch ähnliche Vorgänge in der Natur (Insektenstiche) durchaus Mikroorganismen namentlich in süße Früchte übertragen und hier bisweilen aufgefunden werden können. Ein festgestelltes Vorkommen ist also ohne engeres Verhältnis verständlich.

4. Viertens aber ist ein Teil der hier beobachteten Fälle zweifellos mehr oder weniger vom Gesichtspunkt einer parasitären Erkrankung (Grenzfälle des Parasitismus) aus zu betrachten. Man wird hierzu — im weiteren Sinne, falls man nicht von zufälliger Ansiedlung sprechen will — auch das Vorkommen von Pilzen in den Früchten der *Gramineen* rechnen können, auch wohl den Pilzbefall der *Juniperus*- und *Crataegus*-Beeren. Aber noch eindeutiger werden die Verhältnisse im Falle des Bakterienvorkommens im Kürbis, wo der Zusammenhang mit einem Parasiten der Blütennarbe offen daliegt. Und weiterhin zeigt das Beispiel der *Phyllosticta tirolensis* im Apfelkerngehäuse, daß ein Schädling reifer Lagerfrüchte in den heranreifenden Früchten als harmloser Mitbewohner vorhanden sein kann. Es sind eben Fälle einer verzögerten oder unterdrückten Erkrankung. Man hat ja auch bei extremen Parasiten ähnliche Beispiele, wie beim Weizen- und Haferflugbrand (*Ustilago tritici* und *avenae*).

Zusammengefaßt ergibt sich also aus den vorliegenden Untersuchungen durchaus kein Hinweis auf eine weite oder sogar allgemeine Verbreitung endophytischer Symbionten. Dabei sei noch darauf hingewiesen, daß ja gerade Bakterien, die in dieser Hinsicht besonders beachtet wurden, in den vorliegenden Untersuchungen gegenüber Pilzen durchaus zurücktreten.

Es fragt sich noch, warum der eingedrungene Mikroorganismus nicht als Schädling zur Entwicklung kommt, wobei von der Wirkung etwa vorhandener thermostabiler Gifte wie Anemonin u. dgl. (vgl. oben S. 6) abgesehen sei. Wenn sich Mikroorganismen auf Stücken von gesundem Fruchtfleisch, etwa von Kürbis oder Apfel, nicht recht entwickeln, so könnte an Nahrungsmangel oder an das Vorhandensein bzw. die Bildung thermolabiler mikrobicider Stoffe seitens der Pflanze gedacht werden. In beiden Fällen würde Erhitzen des Fruchtfleisches einen günstigen Nährboden schaffen können, wie wir es tatsächlich beobachten können. Diese Dinge lassen sich im Augenblick jedoch schwer übersehen. Denn einerseits gibt *Dold* eine erst durch Wundreiz entstehende Wirkung des „Wundsekretes" an. Dann läge also kein Grund vor, daß die in den Kürbis eingedrungenen Bakterien sich nicht stärker entwickeln sollten, wenn also die mikrobicide Eigenschaft dem intakten Fruchtfleisch fehlte. Andererseits geht aus den Angaben von *Söding* hervor, daß gewisse Bakterien im unver-

letzten Blatt bald absterben, an Wundstellen und im Preßsaft dagegen wachsen. Man sieht, *allgemein* Gültiges läßt sich zur Zeit über diese Dinge noch nicht aussagen, zumal die vorliegenden Untersuchungen zu dieser Frage keine besonderen Beiträge bringen, da der Gang der Untersuchungen zunächst anders gerichtet war. Es läßt sich eben nur sagen, daß bei parasitären Erkrankungen bzw. beim Vorkommen von Mikroorganismen im lebenden Pflanzengewebe Gleichgewichte mannigfacher Abstufung bestehen werden, die in jedem Einzelfall zunächst einmal einer genauen Analyse unterzogen werden müßten.

Noch auf einen Punkt sei hier aufmerksam gemacht. Bei den von mir untersuchten Fällen handelt es sich in der Hauptsache um fleischiges Gewebe von Früchten, dem man vielleicht keine so große Widerstandskraft gegen das Eindringen eines Mikroorganismus zusprechen kann wie etwa den Zellen der Blätter oder der Samen. Soweit ich solche untersucht habe (Samen von *Vicia Faba*, *Gramineen* innerhalb der Fruchtschale) fand ich ja auch keine Mikroorganismen. Es müßte aber noch Material über diese Frage beigebracht werden, zumal *Niethammer* das Vorkommen von Pilzen in den Aleuronzellen von Getreide-Früchten angibt, was ich indessen niemals beobachten konnte. Auch weitere von *Niethammer* erwähnte Befunde über das Vorkommen von Pilzen in Samen (vgl. S. 2/3) wären zu überprüfen, zumal die Angaben über die Isolierungen meist zu kurz sind.

Nun muß aber noch die entgegengesetzte Seite des Vorkommens von Mikroorganismen in Früchten kurz erörtert werden. Wenn nämlich die beobachteten Mikroorganismen auch keine spezifischen Begleiter im Sinne einer wirklichen Symbiose sind, so schließt das keineswegs aus, daß sie nicht gewisse für die Pflanze nützliche Wirkungen entfalten können. Es würde sich dabei in erster Linie um eine Beeinflussung der Samenkeimung handeln, wie sie das oben beschriebene Auskeimen der Kürbissamen im Innern einer intakten, aber mit *Hormodendron* infizierten Frucht und die Angaben von *Niethammer* zeigen (besonders altes Saatgut soll in seiner Keimung durch Pilze gefördert werden). Ebenso ist bekannt, daß manche Samen erst nach längerer „Rotte" im Boden keimen. Sie werden sich hier nicht der Einwirkung von Mikroorganismen entziehen können, und die Annahme einer gegebenenfalls auch nur gelegentlichen Förderung durch Mikroorganismentätigkeit liegt durchaus nahe, ebenso aber auch, daß es sich dabei nicht um spezifische Wirkungen zu handeln braucht; es kann ja auch die Keimung von Samen von Mykorrhiza-Pflanzen durch gewöhnliche Schimmelpilze gefördert werden (*Freisleben*); und für eine Förderung der Samenkeimung allgemein werden zweifellos viele der im Boden vorkommenden Mikroorganismen in Frage kommen können. Im einzelnen kann es sich dabei um folgende Möglichkeiten handeln:

1. Lieferung wachstumsfördernder Stoffe durch den Mikroorganismus, bei Mykorrhiza-Pflanzen verwirklicht.

2. Zerstörung keimungshemmender Stoffe in der Samenschale oder anderen Teilen von Samen und Frucht (oder auch im Boden vorkommender). Daß dieser Fall verwirklicht sein wird, kann kaum bezweifelt werden.

3. Zerstörung derber, die Keimung hemmender Zellwandschichten, wie z. B. von den Samen von *Symphoricarpus* angegeben ist (*Pfeiffer*).

Wenn also auch gesagt wurde, daß solche Erscheinungen wohl kaum durch spezifische Mikroorganismen durchgeführt werden, so ist doch darauf hinzuweisen, daß eine gewisse Begleit-Mikroflora von Früchten und Samen regelmäßiger auftreten kann, wie *Niethammer* glaubt. Danach handelt es sich um die Mikroflora des Standortes (Bodens), da sie die gleichen Arten hier und in Früchten fand. Man wird das für möglich halten dürfen, muß aber wohl umfangreicheres Material und eingehendere örtlich-ökologische Untersuchungen (vgl. oben S. 13 bei *Juniperus*) abwarten. Die von *Niethammer* gegebenen Listen der Mikroflora unterscheidet sich von den von mir festgestellten Arten stark (Tabelle X). Kein einziger der von ihr angegebenen Pilze wurde von mir gefunden, insbesondere z. B. keine einzige *Mucorinee*. Natürlich kann nicht gesagt werden, ob die Boden-Mikroflora in beiden Fällen so stark verschieden war; man hat fast den Eindruck, daß die Arten von *Niethammer* etwas zahlreich sind und vielleicht doch nicht alle als wirkliche Begleiter von Früchten (d. h. deren innerer Teile) anzusprechen seien.

Bei meinen eigenen Untersuchungen ist es jedenfalls auffallend, daß *Hormodendron chlorinum var. nigrovirens* bei *Juniperus* des Göttinger und Kasseler Standortes vorherrschend war; diese Art erscheint aber auch in einem Falle bei *Avena* vom gleichen Standort. Eine noch häufigere Form ist *Alternaria tenuis*, die bei *Juniperus*, *Triticum*, *Hordeum*, *Malus*, gefunden wurde, bei *Triticum* und *Hordeum* dazu als häufig vertretener Pilz. Es erscheint demnach durchaus möglich, daß sich gewisse Arten vermöge ihrer Konstitution besonders als Früchte-Begleiter eignen; aber auch hier könnten nur ausgedehnte Untersuchungen völlige Klarheit schaffen. Ob dabei Wirkstoffe der Früchte eine Rolle spielen [vgl. *Niethammer* (5)], läßt sich ebenfalls nur auf Grund ausgedehnter Untersuchungen entscheiden.

Zweifellos aber wird man das Zusammenleben von Mikroorganismen mit höheren Pflanzen nicht zu eng nur vom Gesichtspunkt einer vollendeten Symbiose aus sehen dürfen, sondern man wird nach Zusammenhängen weiteren Ausmaßes und geringer Spezifität suchen müssen.

Zusammenfassung.

Aus dem Innern gesunder Früchte konnten *Pilze*, *Hefen* und *Bakterien* isoliert werden.

In Früchten von *Cucurbita pepo* fand sich in 91 % der Früchte *Bacillus vulgatus*, der aber als Parasit der Blütennarbe bekannt ist und von dieser aus offenbar in die Frucht eindringt, ohne sich jedoch in dieser stark zu vermehren.

Die Früchte der *Getreidearten* zeigten in allen Fällen Pilze verschiedener Artzugehörigkeit, aber nur außerhalb der Samenschale, nie in Zellen der Aleuronschicht, des Keimlings oder des Mehlkörpers.

Sehr hohen Pilzbefall, mit verschiedenen Arten, zeigten die Beeren von *Juniperus* und *Crataegus*; der Grad des Befalls wechselte aber sehr stark bis zur völligen Sterilität bei einer Herkunft.

Samen von *Vicia Faba* waren frei von Mikroorganismen, ebenso Früchte von *Viscum* und Fruchtfleisch von *Pyrus* und *Malus*, während im Fruchtfleisch von *Prunus cerasus* und *Ribes Uva-crispa* in geringem Ausmaße Hefen und Bakterien gefunden wurden.

In Früchte eingeimpfte Hefen blieben eine gewisse Zeit am Leben, insbesondere *Torulopsis albida* in *Solanum lycopersicum*. In der Natur können Hefen also durch Insektenstiche gelegentlich in Früchte gelangen und dort aufgefunden werden.

Es ist möglich, aber durch umfangreichere Untersuchungen noch streng zu beweisen, daß die aufgefundenen Mikroorganismen solche des natürlichen Standortes (Bodens) sind. Ebenso erscheint es möglich, daß die Begleiter von Früchten bei der Samenkeimung gewisse fördernde Wirkungen ausüben können, wie *Niethammer* annimmt, und auch hier in einem Falle wahrscheinlich gemacht werden konnte.

Solche Erscheinungen sind aber kaum spezifischer Natur, und alle in den vorliegenden Untersuchungen beobachteten Fälle haben mit einer eigentlichen Symbiose nichts zu tun, sondern können als zufällige Ansiedlungen bzw. als gehemmte oder unterdrückte Infektionserkrankungen (Grenzfälle des Parasitismus) angesehen werden.

Mit Rücksicht auf die Möglichkeit fördernder Wirkungen der Mikroorganismen auf die Samenkeimung und die Häufigkeit des Vorkommens von Mikroorganismen in Früchten wird man die Frage des Zusammenlebens nicht zu eng auf eine eigentliche Symbiose einstellen dürfen, sondern nach Zusammenhängen weiteren Ausmaßes suchen müssen.

Literatur.

Alcorn, C. D., u. *C. C. Yeager*, Stain. Technol. 12, 157, 1937. — *Amlong, H.*, Deutsch. Landw. Presse 68, 105, 1941. — *Appel, O.*, Taschenatlas d. Krankheiten des Kern- u. Steinobstes. Berlin 1938.

Berthold, E., Jahrb. f. wiss. Bot. **57**, 387, 1917. — *Boas, F.*, Dynamische Botanik. München-Berlin, Lehmann, 1937; Ber. Deutsch. Botan. Ges. **52**, 126, 1934. — *Bortels, H.*, Centralbl. f. Bakt. II, **103**, 94, 1941. — *Burcik, E.*, Planta **30**, 683, 1940. — *Burgwitz, G. K.*, Ref. im Bot. Zentralbl. **11**, 315, 1940.

Cappelletti, C., u. *A. Ceruti*, Nov. G. Bot. Ital. **46**, 339, 1939. — *Cauda, A.* ebenda **32**, 36, 1925.

Dold, H., Centralbl. f. Bakt. I, **140**, 265, 1937.

Elfving, F., Soc. Sc. Fenn. Biol. **7**, 4, 1938; **9**, 1, 1941.

Faber, F. C. v., Jahrb. f. wiss. Bot. **51**, 285, 1912. — *Fernbach, M. A.*, Ann. de l'Inst. Pasteur 1888, S. 567.

Freisleben, R., Ber. d. Deutsch. Bot. Ges. **51**, 351, 1933; Jahrb. f. wiss. Bot. **80**, 421, 1934; **82**, 413, 1935.

Günnewig, J., Beitr. z. Biol. d. Pflanzen **20**, 227, 1933.

Haag, F. E., Centralbl. f. Bakt. II, **17**, 1, 1927. — *Harter, L. L.*, u. *Weimer, I. L.* in *Ed. Fischer* u. *E. Gäumann*, Biol. d. pflanzenbewohnenden parasitischen Pilze. Jena, G. Fischer, 1929. — *Hennig, K.*, u. *F. Villforth*, Biochem. Zeitschr. **305**, 299, 1940. — *Hiltner, L.*, Centralbl. f. Bakt. II, **5**, 831, 1899.

Lehmann, K. B., u. *O. Neumann*, Bakteriologie, Bd. II. München 1927. — *Lodder, J.*, Die anaskosporogenen Hefen. Amsterdam 1934.

Miehe, H., diese Zeitschr. **1**, 78, 1930. — *Moriondi, Ch.*, C. R. Soc. Biol. Paris **106**, 351, 1931. — *Müller-Thurgau, H.*, in *Lafar*. Handb. d. techn. Mykologie **5**, 48, Jena 1905/14.

Nestler, A., 1. Ber. d. Botan. Ges. **17**, 320, 1899; 2. ebenda **39**, 230, 1922. — *Niethammer, A.*, 1. diese Zeitschr. **4**, 72, 1933; 2. Die mikroskopischen Bodenpilze. Gravenhage 1937; 3. diese Zeitschr. **9**, 23, 1938; 4. ebenda **10**, 13, 1939; 5. ebenda **11**, 73, 1940; 6. ebenda **12**, 314, 1941.

Osterwalder, Centralbl. f. Bakt. II, **13**, 207, 1904. — *Owen, W. M. L.*, J. of Bact. **1**, 235, 1916.

Peklo, J., Ber. d. Botan. Ges. **31**, 370, 1913. — *Pfeiffer, N. E.*, Contrib. Boyce Thompson Inst. **6**, 103, 1934.

Rayner, M. C., Mycorrhiza. London 1927. — *Rippel, A.*, Mikrobiologie des Bodens in: Handb. d. Bodenlehre von *E. Blanck*, 1. Erg.-Bd. Berlin, Springer, 1939. — *K. Rippel*, 1. Planta **30**, 689, 1940; 2. ebenda **30**, 806, 1940. — *Romwalter, A.* (d. Ältere), u. *A. v. Király*, diese Zeitschr. **10**, 87, 1939.

Schäde, R., Planta **31**, 169, 1940. — *Schanderl, H.*, 1. Gartenbauwissenschaft **13**, 406, 1939; 2. Organismus u. Umwelt 1939, S. 222; 3. Gartenbauwissenschaft **15**, 1, 1940. — *Söding, H.*, Ber. d. Botan. Ges. **57**, 465, 1939. — *Stührk, A.*, Die Obst- und Gemüse-Verwertungs-Industrie, A, Heft 42, 1941. — *Szilvási, J.*, Mitt. a. d. botan. Inst. Sopron 1942 (mit einem Vorwort von *D. Fehér*).

Thomée-Migula, Kryptogamenflora III, **4**, 2, Leipzig 1934.

Watanabe, K., Bot. Mag. Tokyo **47**, 498, 1933. — *Wollenweber, H. W.*, u. *O. A. Reinking*, Die Fusarien. Berlin 1935. — *Wöller, H.*, Centralbl. f. Bakt. II, **79**, 173, 1929.

Zinsser, O., Jahrb. f. wiss. Bot. **30**, 423, 1897.

(Aus der Mikrobiologischen Abteilung des Instituts für Biochemie und Nahrungsmittelchemie der deutschen Technischen Hochschule, Prag.)

Hefen sowie mikroskopische Pilze aus Blüten, ferner von Samen und Früchten.

Von

A. Niethammer.

(Eingegangen am 28. Januar 1942.)

Begründung der Untersuchungen und Angabe des Arbeitsganges.

Die hier mitgeteilten Versuchsergebnisse sollen einen Beitrag dazu liefern, welche Arten von *Hefen* sowie von *mikroskopischen Pilzen* im Nektar, in den Blüten, ferner an Samen und Früchten heimischer Garten-, Wiesen- und Feldpflanzen zu finden sind. Gleichzeitig wurde auch der Frage nachgegangen, inwieweit auch im *Innern* von Früchten bzw. Samen, ohne auf pathologische Erscheinungen einzugehen, pilzliche Mikroorganismen anzutreffen sind. Ebenfalls zu prüfen ist, inwieweit die Samen in der intakten Frucht *keimfrei* sind.

Die *Blüten* wurden in den Monaten Mai bis Juli gesammelt, und zwar teils in der Umgegend Prags, teils im botanischen Garten der Karls-Universität. Im Laboratorium wurden sie 24 Stunden unter Glasglocken bewahrt. Durch leichten Druck mit dem Finger wurde aus den Blüten der Nektar in Form kleiner Tröpfchen gequetscht und mit sterilen Nadeln auf die Nährsubstrate übertragen. In manchen Fällen wurde auch mit einem sterilen Skalpell ein kleiner Teil des Blütenbodens auf die Nährsubstrate gegeben.

Bei den *Früchten* und *Samen* war die Auswahl des Materials sehr wichtig. Normale Handelsware kommt im allgemeinen nicht in Frage. Die Proben wurden teils selbst gesammelt, teils wurden sie uns von verläßlichen Züchtern oder Gärtnern überlassen. Die Samen und Früchte wurden mit Alkohol gereinigt, mit sterilem, destilliertem Wasser gewaschen, um die zufällig anhaftenden Mikroorganismen zu beseitigen. Die fleischigen Früchte wurden mit dem ausgeglühten Messer aufgeschnitten. Stücke des Fruchtfleisches aus den inneren Partien, sowie die unter sterilen Bedingungen entnommenen Samen dienten der Untersuchung. Harte Früchte und alle Samen müssen 1 Stunde unter sterilen Bedingungen in Wasser bei etwa 18° quellen. Dann wurden mit dem ausgeglühten Messer Schnitte von Schale und Kern hergestellt, die gesondert in die Nährsubstrate gelegt wurden.

Mit dem Studium der Mikroorganismen des Nektars, insbesondere der *Hefen*, haben sich früher bereits u. a. *Hautmann*, *Zinkernagel* und

Niethammer befaßt. *Hautmann* beschäftigte sich nur mit einer Art, dem *Anthomyces Reukaufii*. *Zinkernagel* isolierte sehr verschiedene *Hefen*, ohne aber eine systematische Einreihung vorzunehmen. *Niethammer* wies neben *Hefen* auch auf andere mikroskopische *Pilze* hin.

Über das Vorhandensein von *Hefen* sowie mikroskopischen *Pilzen* an und in Samen bzw. Früchten hat *Niethammer* ebenfalls wiederholt berichtet. Ihre Untersuchungen lassen vermuten, daß auch im Innern gesunder Samen und Früchte Mikroorganismen zugegen sein können. Sie müssen nicht immer vorhanden sein. Dafür spricht die Arbeit von *K. Rippel*, die beweist, daß im Innern gesunder Weintrauben keine Mikroorganismen anzutreffen sind. *Hefen* und *mikroskopische Pilze*, die den aus der Natur unmittelbar entnommenen Samen bzw. Früchten *anhaften*, interessieren naturgemäß auch.

Die Rohkulturen zur Heranzucht der Mikroorganismen wurden in Bierwürze (4° Ball.), Hefewasser mit 2% Glucose (*Henneberg*) und auf Bierwürze, sowie Hefewasseragar (1,5% Agar-Agar) hergestellt. Zur Reinkultur wurden zunächst die gleichen, zur näheren Charakteristik auch Spezial-Nährböden benutzt. Zum Studium des Wachstumsbildes dienten reine Zuckerlösungen.

Zusammensetzung der Zuckerlösungen: 2% Saccharose *oder* Glucose, 0,1% $(NH_4)_2SO_4$, 0,01% KH_2PO_4, 0,01% $MgSO_4$.

Das Farbenspiel der Kulturen wurde in der *Woeltje*-Lösung verfolgt. *Lösung nach Woeltje*: 7,5% Saccharose, 1% Asparagin, 0,5% KH_2PO_4, 0,25% $MgSO_4$, dest. Wasser.

Perwoznansky machte aufmerksam, daß viele Hefen und auch mikroskopische Pilze, besonders solche mit schwacher oder fehlender Gärkraft, Chinasäure als C-Quelle verwerten können. Dabei können interessante Verfärbungen von Substrat und Pilz verzeichnet werden. *Chinasäure-Nährlösung nach Perwoznansky*: 2 g Chinasäure, 0,1 ccm 20%iger NH_3-Lösung, 0,03 g KH_2PO_4, 0,15 g $MgSO_4$, 0,003 g $FeCl_3$, Na_2CO_3 bis zur Neutralisation gegen Lackmus. Dazu 1,5% Agar-Agar.

Im Anschluß an die auf Chinasäureagar gewonnenen Erfahrungen wurde das Gärvermögen der Hefen und anderer hier gut gedeihender Mikroorganismen geprüft. Für diese Zwecke bedienten wir uns wieder des Hefewassers, das jeweils einen 2%igen Zusatz von Glucose oder Saccharose erhielt. Die Beobachtung erfolgte in Einhorn-Gärröhrchen. Das Sporenbildungsvermögen der *Hefen* wurde auf Gipsblöcken und Kartoffelscheiben verfolgt (vgl. *F. Wagner*). In manchen Fällen bewährte sich auch Bierwürze- oder Chinasäureagar. Perithezienbildung glückte bei manchen *Ascomyceten* auf Bierwürzeagar. Unsere frühere Beobachtung bestätigte sich wieder, daß frisch aus der Natur stammendes Material eher Perithezien bildet als solches nach einem langen Aufenthalt im Laboratorium.

In einzelnen Fällen interessierte auch die Wachstumsmöglichkeit auf cellulose- bzw. ligninhaltigem Material. Zu diesen Zwecken dienten Sulfitcellulose und Holzschliff, wie sie fabrikmäßig hergestellt werden. Zur Befeuchtung diente eine nach *Stapp* hergestellte Nährlösung. *Nährlösung nach Stapp*: Leitungswasser 1000, $(NH_4)_2SO_4$ 0,5, KH_2PO_4 0,25, $MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$ 0,1 + H_2SO_4 bis zur schwach-sauren Reaktion. p_H etwa 6,0.

Die Kulturen fanden bei 26° Aufstellung in einem Brutschrank. Gelegentlich wurden zum Vergleich niedrigere oder höhere Temperaturen geprüft, ohne einen besseren Erfolg zu haben. Die Gärung wurde bei 20 und 25° verfolgt.

Die festen Nährböden gelangten in Petri-Schalen und Reagenzröhrchen zur Anwendung. Dies gilt auch für Sulfitcellulose und Holzschliff. Die Nährlösungen reichten wir in 100-ccm-Erlenmeyerkolben und bei den Hefen vorwiegend in Freudenreich-Kölbchen. Die Gipsblöcke fanden in kleinen Petrischalen Aufnahme. Als Impfmaterial dienten nach *F. Wagner* stets frisch auf Bierwürze gezüchtete Stämme. Die Anfeuchtung der Blöcke erfolgte mit Bierwürze.

Aufzählung und Beschreibung der isolierten Formen.

Die Abhandlung der isolierten Mikroorganismen (ausschließlich *Ascomycetes* bzw. *Fungi imperfecti*) erfolgt systematisch. Wir benutzten die von *Gäumann* gegebene Einteilung, wobei aber in manchen Fällen die Erkenntnis neuerer Literatur berücksicht werden muß.

In der Ordnung der *Endomycetales* wurde aus der Familie der *Saccharomycetaceae*, welche die askosporogenen Hefen enthält, kein Vertreter isoliert.

Die Ordnung der *Exoascales* enthält in der Familie der *Candidaceae* nach den neuesten Einreihungen von *Windisch Torulopsis pulcherrima (Lindner) Sarcardo*, die nach dem zitierten Autor als *Candida pulcherrima* bezeichnet wird. Wir wollen die von *Lodder* bei den anaskospogenen Hefen eingereihte Form hier anschließen. *Windisch* beobachtete die Bildung von Ascosporen, die wir nach unseren Kulturen bestätigen können. *Windisch* isolierte sie von *Kirschen* und *Johannisbeeren*, wir von dem steril entnommenen Fruchtfleisch einiger *Pfirsiche*.

In Bierwürze sowie auf Bierwürzeagar ist die Vielgestaltigkeit der Zellen zu erwähnen (vgl. *Windisch*). Rasches Wachstum, zunächst wie es *Lindner* (vgl. *Lodder*) beobachtet, vorherrschend längliche Zellen, die sich später beträchtlich vergrößern und abrunden. Bildung einer großen oder mehrerer kleiner Fettkugeln in den Zellen. Die typischen „*pulcherrima*“-Zellen sind vorhanden. In älteren Kulturen findet man gelegentlich die Bildung von Pseudomycel. Aus den runden Zellen entwickelt sich bei neuerlichem Überimpfen wieder eine Generation mit länglichen Zellen. Äußerlich erscheint die Kultur auf Bierwürzeagar weißlich glänzend, deutlich am Rande gezackt. Fast keine Farbstoffbildung. Nach den Angaben von *Lodder* muß diese nicht allen Stämmen eigen sein. In Bierwürze ist nach 48 Stunden ein deutlicher Bodensatz, später auch Ringbildung. Glucose und Saccharose werden schwach vergoren.

Auf Chinasäureagar beginnt das Wachstum nach 24 Stunden. Es entsteht ein weißgelber Belag. Der Nährboden ist zunächst hell, bald erscheint er rosa. Nach etwa 1 Woche werden Belag und Substrat dunkel, noch etwas später schwarz. Die anfangs länglichen, später

runden Zellen haben sich, wie die mikroskopische Kontrolle lehrt, in derbwandige Dauerzellen verwandelt. Dieser Vorgang dauert etwa 10 Tage. Einige Tage später bilden diese Zellen in der von *Windisch* beschriebenen Art einen Ascus, in dem 4 bald frei werdende Sporen entstehen. Gipsblöcke zeigen nach mehreren Tagen derbe Dauerzellen mit viel Fett, aber ohne Sporenbildung. Kartoffelscheiben werden von einem gelbweiß-glänzenden Überzug, mit gezacktem, rosa Rand überzogen. Auf Zellstoff und Holzschliff unterbleibt das Wachstum vollkommen. Diese Versuche wurden angestellt, da *Melin* und *Rennerfeld* über die starke Verbreitung von Hefen und hefenartigen Pilzen auf Holzschliff sowie Zellstoff in Schweden berichten.

Ordnung Plectascales.

Die Familie der *Aspergillaceae* ist mit verschiedenen Gattungen vertreten.

Gattung Penicillium.

Aus der Gruppe *Monoverticillium* wurde *P. glaber Wehmer* verschiedentlich isoliert. 1. Aus dem steril entnommenen Kerngehäuse von verschiedenen Früchten des *Malus silvestris*. 2. Kern von *Corylus Avellana*, welcher unter sterilen Bedingungen entnommen wurde. 3. Testa, *Gurke*, Ernte 1938, Delikatas, Versuchsfeld, Pflanzenbau, Tetschen-Liebwerd. 4. Samen, *Glycine Soja*, keimfrei der Hülse entnommen.

Ausgezeichnet durch sehr gutes Wachstum auf Sulfitcellulose, zerkleinerten Haselnußschalen, Hülsen der Sojabohne.

Die Gruppe *Asymmetricum* stellt mehrere Vertreter. *P. notatum Westling* wurde isoliert von: 1. *Prunus Persica*, Kern, steril der Frucht entnommen. 2. Blüte, *Forsythia suspensa*. 3. Testa, *Eier-* und *Rheinlandbohne*, Ernte 1938, 1939, Tetschen-Liebwerd, Versuchsfeld, Pflanzenbau. Auf Bierwürzeagar blaugrüne Decken, typische Radialfalten. *Woeltje*-Lösung zeigt blaugrüne Decken, gelbe Unterseite und gelbe Nährflüssigkeit. Auf den Glucose- oder Saccharoselösungen blaugrüne Decken. Sulfitcellulose läßt blaugrüne Decken entstehen, die aber nur oberflächlich im Substrat verankert sind.

P. lanosum Westling wurde auf Kernen von *Vitis vinifera*, die steril der Frucht entnommen wurden, gefunden.

Verbreitet ist *P. italicum Wehner*. Es wurde isoliert von 1. Fruchtsaft, steril entnommen, *Citrus nobilis*. 2. Fruchtsaft, ebenso, *Citrus aurantiacum*. 3. Testa *Eierbohne* 1938, 1939, Versuchsfeld, Pflanzenbau, Tetschen-Liebwerd. 4. Testa, *Zuchterbse*, Haid bei Tachau. Auf Bierwürzeagar ist der große, sehr derbe, eckige Konidienträger zu nennen; sie sind auf der Platte zu dicken Büscheln angeordnet. Die Konidienfarbe ist stahlblau. In diese Konidiendecke werden kleine rosa und weiße, sterile wie fertile Sklerotien gesetzt. Auf Sulfitcellulose entstehen grüne, körneliche Decken. Holzschliff ermöglicht keine Entwicklung. Mit Stamm 4 dieser Art führten wir wiederholte Impfungen einzelner Konidien durch. Der Konidienträger ist in Größe sowie Zahl seiner einzelnen Glieder starken Schwankungen

unterworfen. In einzelnen Fällen können Rami, Ramuli und Sterigmen sogar regelmäßig ausgebildet sein.

Für *P. expansum Link* konnten wir bereits früher Verbreitung auf Samen und Früchten angeben. Hier wurde es gleichfalls einige Male isoliert. 1. Kern, *Corylus Avellana*, steril entnommen. 2. *Malus silvestris*, steril dem Fruchtfleisch entnommen. 3. Same *Glycine Soja*, keimfrei der Hülse entnommen. 4. *Pyrus communis*, steril dem Fruchtfleisch entnómmen. 5. *Rhinanthus minor*, steril der Kapsel entnommen. 6. Testa, Kern, *Gurke* Delikatas, Versuchsfeld, Pflanzenbau, Tetschen-Liebwerd. 7. Testa *Bohne*, Saxen, ferner Rheinlandbohne, 1938, 1939, gleiche Herkunft. 8. Testa *Pisum sativum*, Postelberg 1929. Diese Art ist durch die Ausbildung der typischen gestielten, oft federförmigen Koremien gekennzeichnet. Diese Ausbildungsart ist auf Streifen von Sulfitcellulose sowie zerkleinerten Haselnußschalen sehr deutlich. Bei den unter 7 angeführten Stämmen verfolgten wir wieder bei unterschiedlichen Überimpfungen auf Bierwürzeagar die mikroskopische Ausbildung des Konidienträgers. Die Art der Verzweigung sowie die Zahl der Stockwerke ist mannigfachen Schwankungen unterworfen. Typisch ist nur die stets eckige Ausbildung der Teilstücke des Trägers.

Die Gruppe *Symmetricum* stellt in *P. bicolor Fries* einen bekannten Vertreter. Er wurde isoliert: 1. Samen, *Lupinus albus*, steril der Hülse entnommen. 2. Samen, *Fraxinus excelsior*. Die typischen Koremien mit gelbem Fuß und grünem Köpfchen fallen auf. Auf Sulfitcellulose sind sie in dichten Reihen erkennbar.

P. elegans Corda, das auf Bierwürzeagar durch seinen hellgrünen, samtigen Belag kenntlich ist, wurde einige Male isoliert. 1. Saft, steril entnommen von *Citrus nobilis*. 2. Fruchtfleisch, steril abgelöst von *Vitis vinifera*. Gelegentlich auch aus Rheinweinen. 3. Testa, *Kohlsamen*, Versuchsfeld, Tetschen-Liebwerd. 4. Testa, *Eierbohne*, Ernte 1938, gleiche Herkunft. 5. Fruchtfleisch, steril entnommen, *Malus silvestris*. Sehr gutes Wachstum auf Sulfitcellulose. In den hellgrünen Decken zahlreiche gelbe, meist sterile Sklerotien. In *Woeltje*-Lösung sind die stechend gelben Abscheidungen in die Flüssigkeit typisch. Hier wie auf der gewöhnlichen Glucose- und Saccharoselösung geschlossene Decken. Angenehmer, parfümartiger Geruch.

Gattung Gliocladium.

G. deliquescens Sopp wurde von Samen isoliert, die unter sterilen Bedingungen der Frucht von *Ribes Uva crispa* entnommen waren. Auf Bierwürzeagar hellgrüne Lager, die mit zunehmendem Alter in Übereinstimmung mit den Angaben von *Sopp* etwas verschleimen. Der Konidienträger ist nach dem Bau eines *Penicillium* gestaltet. In Bierwürze erfolgt die Entwicklung submers. Auf Chinasäureagar tritt deutliches Wachstum ein. Das Substrat bleibt hell. Glucose und Saccharose werden schwach vergoren. Nach *Sopp* soll Bildung von Buttersäure erfolgen.

Gattung Acaulium.

A. albo-nigrescens Sopp wurde einmal aus dem Nektar der Blüte von *Prunus Cerasus* isoliert. Auf Bierwürzeagar sind in dem gelblichen Mycel die dunklen Perithecien maßgebend. Entspricht den von *Sopp* gemachten Angaben.

Gattung Scopulariopsis.

S. brevicaule Thom-Bainier wurde ebenfalls einmal aus der Blüte von *Prunus cerasus* isoliert. Keine Abweichungen gegenüber der Beschreibung bei *Thom.*

Ordnung Sphaeriales.

Die Familie *Mycosphaerellaceae* ist durch *Sphaerulina intermixta* und *Mycosphaerella Tulasnei* hier vertreten. *Sphaerulina intermixta*, deren Konidienform als *Dematium pullulans de Bary* bekannt ist, wurde sehr oft isoliert. In Blüten und Früchten ist es ein häufiger Begleiter der mannigfachsten Hefen. Wir führen nachstehende Isolierungen an:

1. Blüte, *Ribes rubrum*, Prag, Garten. 2. Fruchtfleisch, *Tomate*, ebenda. 3. *Prunus Persica*, innere Partien des Fruchtfleisches, Garten, Leitmeritz. 4. Nektar, *Prunus Cerasus*, Garten, Prag. 5. Nektar, *Trifolium pratense*, Wiese bei Prag. 6. Nektar, *Barbarea vulgaris*, Wiese bei Prag. 7. *Malus silvestris*, Nektar, Garten, Prag. 8. *Coronilla varia*, Nektar, Waldrand unweit Prags. 9. *Salvia pratensis*, Nektar, Wiese unweit Prags. 10. *Epilobium angustifolium*, Nektar, Waldlichtung bei Prag. 11. *Arnica montana*, Blüte, Botanischer Garten, Universität. 12. Testa der Samen, *Eierbohne*, *Rheinlandbohne*, *Gurke* Delikatas, Versuchsfeld Pflanzenbau, Tetschen-Liebwerd. 13. Samen steril den Früchten von *Vitis vinifera* und *Malus silvestris* entommenn, nicht ausgereift, Melnik. 14. Samen steril der Frucht von *Pyrus communis*, Garten, Prag, entnommen. 15. Kern, unter sterilen Bedingungen der unreifen Frucht von *Aesculus Hippocastanum* entnommen.

Dieser Pilz, der neuerdings von *Bauer* in physiologischer Hinsicht beschrieben wurde, ist durch seine Vielgestaltigkeit bekannt. Auf Bierwürze- und Hefewasseragar entsteht rasch ein gelblich-weißer, schnell sich verbreitender, schleimiger Belag. In dieser Wachstumsphase sind die hefeartigen Konidien, fädiges Mycel, sowie Sproßmycel zu beobachten. In allen Teilen Speicherung von Öltropfen. Nach einiger Zeit kann, aber muß nicht immer, ein Nachdunklen der Kultur eintreten. Dieser Vorgang kann so weit schreiten, daß der ganze Belag in eine glänzende, schwarze Masse verwandelt wird. Die erwähnte Erscheinung erfolgt durch die Bildung dunkler Gemmen in Konidien und Mycel. sie sind dickwandig und lagern einen dunklen Farbstoff und Fett ab. Überimpft man auf frisches Nährsubstrat, so entsteht wieder der erwähnte Schleim. Diese Gemmenbildung setzt bei den verschiedenen Stämmen ungleich rasch ein und bleibt bei manchen auch aus.

Die Wachstumsmöglichkeit auf Chinasäureagar wurde bereits früher an dem Erdreich entnommenen Formen geprüft. Diese Prüfung fiel damals negativ aus. Die nun isolierten Stämme gehen auf diesem Substrat langsam an. Es wird in den meisten Fällen ein erst heller, bald nachdunkelnder Belag geformt. Das Substrat bleibt zunächst hell. Bei längerer Kulturdauer tritt dunkle Tönung ein. Den hier isolierten Stämmen geht Gärkraft gegenüber Glucose und Saccharose ab. In den

Zuckerlösungen werden helle, schleimige Lager gebildet. Fettabsonderung in den Hyphen, schwache Gemmenbildung. Zunehmende Kulturdauer, bei Eintrocknen oder Erschöpfung der Nährsubstrate, steigert die Fettabsonderung mächtig. Einzelne Stämme schreiten rasch zur Bildung der dunklen Perithecien. Bei Stamm 1 wird diese in Gemeinschaft mit *Fusarium bulbigenum*, das der gleichen Blüte entstammt, deutlich gefördert. Bierwürzeagar ist für diese Perithecienbildung sehr geeignet. Die Perithecien selbst sind wollig, stecknadelkopfgroß, dunkel. Sie enthalten die länglichen Asci. Zu erwähnen ist, daß jene Stämme, die einen langsamen Aufgang zeigen, dann rasch zur Gemmenbildung schreiten.

Mycosphaerella Tulasnei ist als Konidienform unter dem Namen *Cladosporium herbarum Pers.* bekannt. Diese auch als Schwärzepilz bezeichnete Art wurde verschiedentlich isoliert.

1. Nektar, *Malus silvestris*, Garten, Prag. 2. *Malva pusilla*, Nektar, Botanischer Garten, Universität. 3. Samen, *Glycine Soja*, steril der Hülse entnommen. 4. Kern *Corylus Avellana*,* steril der Frucht entnommen. 5. Samen, *Geranium pratense*, steril der Frucht entnommen. 6. Testa der Samen, *Eierbohne*, *Bohne* Saxen, *Gurke* Delikatas, Versuchsfeld, Pflanzenbau, Tetschen-Liebwerd, Saaterbse, Haid bei Tachau, Victoria-*Erbse*, Postelberg.

Auf Bierwürzeagar eingesenkte dunkle Hyphen, darüber ein graues Luftmycel. In Bierwürze- sowie Zuckerlösungen submerse Lager. Chinasäureagar ermöglicht gutes Wachstum, schwarze eingesenkte Lager. Das Substrat nimmt sehr allmählich eine dunkelgrüne Tönung an. In den Hyphen Absonderung kleiner Öltropfen. Gärkraft gegenüber Glucose und Saccharose ist nicht vorhanden.

Cellulosehaltiges Material wird gern besiedelt und ermöglicht die Ausbildung schwarzer Lager mit darüberstehendem Luftmycel. Wir nennen Sulfitcellulose, Hülsen von *Glycine Soja*, zerkleinerte Haselnußschalen. In Keimversuchen erkannten wir die Entwicklung dieser Pilze auf den entleerten Samenschalen.

Sklerotienbildung tritt auf allen benutzten Nährböden leicht ein. In einzelnen Fällen trat auf den entleerten Samen im Keimverlauf (Eierbohne, Saaterbse) Perithecienbildung ein.

Ordnung Hypocreales.

In der Gruppe *Didymosporeae-Dictyosporeae* ist *Verticillium agaricium* zu erwähnen, dessen höhere Fruchtform bei *Hypomyces* steht. Diese Art ist an dem Samen von *Rhinanthus minor*, der steril der Kapsel entnommen wurde, gefunden worden. Gelbliche Mycellager mit hyalinen Konidien sind zu erwähnen: daselbst entstehen die dunklen, runden Perithecien.

Ordnung Pezizales.

Familie Pezizaceae.

Botrytis cinerea Klebahn als Konidienform, ist bei Bildung von sterilen und fertilen Sklerotien unter dem Namen ***Sklerotinia Libertiana*** bekannt.

Isolierungen erfolgten aus Blüten, Früchten und Samen. 1. Nektar, *Forsythia suspensa*, Garten, Prag. 2. Nektar, *Malus silvestris*, ebenda. 3. Blüte, *Spiraea vulgaris*, ebenda. 4. Nektar, *Salvia pratensis*, Wiese, unweit Prags. 5. Nektar, *Trifolium pratense*, Wiese, ebenda. 6. *Corylus Avellana*, Kern steril der Frucht entnommen. 7. Testa der Samen *Eierbohne*, *Rheinlandbohne* 1938, 1939, *Gurke* Delikatas, Versuchsfeld, Tetschen-Liebwerd, Pflanzenbau. 8. Samen, steril der Schale von *Raphanus Raphanistrum* entnommen.

Auf Bierwürzeagar Bildung eines grauwolligen Mycels, in dem zahlreiche dunkle Sklerotien eingelagert sind. In Zuckerlösungen entwickeln sich aus diesen Sklerotien weiße bis graue submerse Lager, mit Fetttröpfchen, in den Hyphen. Auf Chinasäureagar entstehen weißgraue Lager, das Substrat bleibt hell. Auf Cellulosestreifen ist das Wachstum sehr gut; die Hyphen sind stark verbreitert und führen deutlich Öltropfen. Gärkraft gegenüber Glucose und Saccharose ist nicht vorhanden.

Monilia nigra Burri-Staub wurde aus dem Nektar von *Tilia platyphyllos* isoliert. Auf Bierwürze- sowie Chinasäureagar schwarze, eingesenkte Lager. Glucose und Saccharose werden nicht vergoren. Deutliche Bildung von Gemmen.

Fungi imperfecti.

Es wurden zahlreiche Vertreter isoliert. Zunächst wird die Familie der *Mucedinaceae* behandelt. Im Anschluß daran ist ein längerer Abschnitt den *anaskosporogenen Hefen* gewidmet. Als Schluß sind die Familien der *Dematiaceae* und *Tuberculariaceae* angereiht.

Familie Mucedinaceae.

Cephalothecium roseum wurde wiederholt isoliert.

1. Nektar, *Prunus Cerasus*, Garten, Prag. 2. Nektar, *Malus silvestris*, ebenda. 3. Samen, steril der Frucht entnommen, *Geranium pratene*. 4. Kern, *Corylus Avellana*, steril der Schale entnommen. 5. Testa der Samen *Eierbohne*, *Bohne* Saxen, 1938, 1939, Versuchsfeld, Pflanzenbau, Tetschen-Liebwerd, Zuchterbse Haid.

Auf Bierwürzeagar eine rosa, leichte Decke. Auf Chinasäureagar gute Entwicklung; das Substrat bleibt hell. Glucose und Saccharose werden nicht vergoren. In Zuckerlösungen helle, submerse Lager. Auffallend ist die sehr starke Entwicklung auf Holzschliff, welche diejenige auf Sulfitcellulose bei weitem übertrifft.

Anaskosporogene Hefen.

Hier sind mehrere Familien abzuhandeln, wir beginnen mit den *Nectaromycetaceae*.

Nectaromyces oder *Anthomyces Reukaufii Grüss*, der von *Hautmann* genau beschrieben ist, stellt eine typische Nektarhefe dar. Wir isolierten ihn desgleichen verschiedentlich.

1. Nektar und später auch Fruchtfleisch *Ribes Uva-crispa*, Garten, Prag. 2. Nektar, *Trifolium pratense*, Wiese bei Prag. 3. Nektar, *Tilia platyphyllos*, Park, Prag. 4. Nektar, *Salvia pratensis*, Wiese bei Prag. 5. Nektar, *Vicia sativa*, Botanischer Garten, Universität. 6. Nektar, *Prunus Armeniaca*, Garten bei Prag.

Für diesen Pilz ist typisch, daß er seine hefeartigen Zellen so zusammenfügt, daß sie ein Kreuz bilden. Man heißt dies nach *Grüss* und *Hautmann* die sogenannte Kreuzform. Diese typische Gestalt wird allerdings nicht immer ausgebildet; man erkennt sie im Nektar und in Nährsubstraten, welche diesem in chemisch-physiologischer Hinsicht gleichen. In Bierwürze und Hefewasser erkannten wir bei frischen Isolierungen ebenfalls die Kreuzform, deren Bildung aber bei fortschreitender Kultur in synthetischen Medien verlorenging. Auf Bierwürzeagar sieht man langgestreckte Zellen, die sich zu Verbänden vereinigen. Der Belag ist glänzend weiß. Chinasäureagar ermöglicht nur eine schwache Entwicklung. Hefe und Substrat sind braun gefärbt. Mit zunehmender Kulturdauer sind in den alten Hefezellen die von *Hautmann* erwähnten Fetteinschlüsse zu sehen. Bildung von derben Dauerzellen ist auch möglich. *Hautmann* gibt je nach den Stämmen wechselndes Gärvermögen gegenüber Fructose, Glucose und Saccharose an. Bei unseren Stämmen ist die Gärkraft gegenüber Glucose und Saccharose stets schwach. Das Wachstum in diesen Lösungen ist immer gut. Auf Gipsblöcken oder Kartoffelscheiben tritt nie Sporenbildung ein; Ablagerung großer Fetttropfen in den Zellen ist zu verzeichnen (vgl. *F. Wagner*).

Die Familie der *Rhodotorulaceae* ist durch den Besitz eines roten carotinoiden Farbstoffs ausgezeichnet. *Rh. glutinis var. rubescens (Saito) Lodder* wurde einige Male isoliert.

1. Nektar, *Sinapis arvensis*, Feld bei Prag. 2. Nektar, *Ajuga reptans*, Wegrand bei Prag. 3. Nektar, *Tilia platyphyllos*, Park, Prag. 4. Fruchtfleisch, *Pyrus communis*, steril der Frucht entnommen. 5. Blüte, *Laburnum anagyroides*, Park, Prag. 6. Testa, *Weizen*korn, Feld bei Tetschen-Liebwerd. 7. Testa, *Gurke* Delikatas, Versuchsfeld Pflanzenbau, Tetschen-Liebwerd. 8. Samen, steril der Frucht entnommen. 9. *Epilobium angustifolium*, Waldlichtung bei Prag.

In Bierwürze rundliche bis ovale Zellen, $4 \times 4{,}5-5\ \mu$, einzeln oder zu zweien. Bodensatz, später leichte Ringbildung. Beides rosa

getönt. Auf Bierwürzeagar rötliche bis orangerote, weiche glänzende Lager.

Chinasäureagar ermöglicht sehr starkes Wachstum, rotbraune Lager, auch das Substrat wird leicht verfärbt. Keine Gärkraft gegenüber Glucose und Saccharose. Das Wachstum ist stets kräftig; Ausbildung typischer, runder Zellen mit einem Fetttropfen, Farbstoffbildung. Auf Gipsblöcken und Kartoffelscheiben unterbleibt die Bildung von Sporen; starke Fettabsonderung in den Zellen. Schwedische Forscher (vgl. *Melin*) fanden Vertreter dieser Familie auf Holzschliff. Aus diesem Grunde interessierte es, einmal die Wachstumsmöglichkeit dieser Art auf Holzschliff sowie Sulfitcellulose zu verfolgen. Das Wachstum bei 18°, 25°, 30° war stets nur schwach. In diesem Zusammenhang erwähnen wir auch eine Isolierung von einem in Mähren hergestellten Holzschliff. Die Entwicklung auf dem eigenen Holzschliff war auch nicht besser.

Rh. korallina (Saito) Harrison. In Bierwürze wird ein schleimiger, rosa Bodensatz gebildet. Die Zellen sind oval, wurstförmig, gekrümmt. Auf Bierwürzeagar rosa bis rote, glänzende, schleimige Lager. Zellgestalt wie oben; Austreibungen sowie Ausbuchtungen der Zellen sind nicht selten. Auf Chinasäureagar entstehen braunrote Lager; das Substrat wird leicht-braun getönt. Gärkraft gegenüber Glucose und Saccharose tritt nicht ein; das Wachstum ist kräftig. In älteren Zellen große Fetttropfen. Sporenbildung auf Gipsblöcken oder Kartoffelscheiben tritt nicht ein.

Diese an sich seltene Art wurde aus dem Nektar von *Salvia pratensis*, Wiese bei Prag, isoliert.

Aus der Familie der *Torulopsidaceae* ist die Unter-Familie der *Torulopsoideae* mit einigen Vertretern zu nennen.

a) Stämme mit Gärvermögen nach *Lodder*.

Torula utilis Lodder. Bierwürze runde, ovale Zellen, Bodensatz; vgl. *Lodder*. Mit zunehmendem Alter Fetttropfen in den Zellen. Auf Bierwürzeagar Zellgestalt ähnlich, weißgelbe, glänzende Lager. Chinasäureagar zeigt braune Lager und ein ähnliches Verfärben des Substrates. Glucose, Saccharose, Fructose werden schwach vergoren. Auf Gipsblöcken und Kartoffelscheiben Bildung kräftiger Dauerzellen mit Fetttropfen; nie Sporenbildung.

Isoliert von 1. Nektar, *Tropaeolum mojus*, Garten, Prag. 2. Nektar, *Coronilla varia*, Wiese bei Prag. 3. Blüte von *Malva neglecta*, Botanischer Garten, Prag. 4. Blüte, *Arnica montana*, ebenda. 5. Fruchtfleisch, *Malus silvestris*, steril entnommen, Garten in Prag.

T. collicula (Hartmann) Sacc. Bierwürzelösung runde bis ovale Zellen, einzeln, zu zweien und zu dritt; vgl. *Lodder*. Durchmesser

3,57 μ. Große Fetttropfen, Bodensatz. Auf Bierwürzeagar Zellgestalt ähnlich. Lager sind glatt, feucht, glänzend; im Alter deutliche Erhebungen. Auf Chinasäureagar ist das Wachstum schwach; helle, allmählich braun werdende Lager. Substrat rosa. Glucose sowie Saccharose gestalten gutes Wachstum und werden schwach vergoren. Fetteinschlüsse in den Zellen. Besonders starke Absonderung von Fettkugeln erfolgt auf Hefewasseragar. Auf Gipsblöcken und Kartoffelscheiben keine Sporenbildung.

Isoliert aus dem unter sterilen Bedingungen zerlegten Fruchtfleisch von *Malus silvestris*. Dieser entstammte einem Garten in Prag.

T. pulcherrima, variabilis Lodder. Diese nach *Lodder* umgrenzte Form lassen wir vorläufig hier stehen. Sie wurde unter sterilen Bedingungen dem Fruchtfleisch von *Rubus idaeus* entnommen. Die Früchte stammten aus dem Brdy-Wald.

In Bierwürze runde, 4—5 μ große Zellen, mit einem Fetttropfen. Einzeln, zu zweit und zu dritt, daneben auch längliche Zellen, 1,5—3 × 2—4 μ Bodensatz. Dieser ist nach 3—4 Tagen rosa getönt. Auf Bierwürzeagar ist die Zellgestalt ähnlich. Weiche, glänzende, gelbliche bis weiße Lager, radiale Streifen. Der eingebuchtete und gelappte Rand fällt durch die schöne himbeerfarbene Tönung auf. Estergeruch. Auf Chinasäureagar rotbraune Lager. Das Substrat bleibt hell. Gärkraft gegenüber Glucose und Saccharose ist vorhanden. Das Wachstum ist auch sehr kräftig. Auf den Gipsblöcken entstehen die typischen „*pulcherrima*“-Zellen (vgl. *Lodder*). Große Fettkugeln im Innern der Zellen. Keine Bildung von Sporen, wie sie bei der Hauptart erkannt wurde. Auf Hefewasseragar entstehen derbe Zellen mit großen Fetttropfen. Die gelb-weißen Lager auf Kartoffelscheiben fallen durch den breiten, roten Rand auf.

b) Stämme ohne Gärvermögen.

T. minor (Pollaci-Naumizzi) Lodder. Bierwürze sehr kleine Zellen, oval bis rundlich, 2,5—4 × 3,5—5 μ Sproßverbände. Bodensatz. Bierwürzeagar Zellgestallt ähnlich. Weiße, weiche, mattglänzende Lager. Wachstum auf Glucose und Saccharose. Gärung tritt aber nicht ein. Die Entwicklung auf Chinasäureagar erfolgt langsam. Erst helle, dann braune Lager. Das Substrat wird allmählich schwarz verfärbt. Auf Gipsblöcken runden sich die Zellen stark ab, speichern kräftig Fett, bilden aber keine Sporen. Kartoffelscheiben lassen dichte, glänzende Lager entstehen. Auf Hefewasseragar tritt in den Zellen sehr starke Speicherung von Fett ein.

Verschiedene Isolierungen liegen vor. 1. Samen, die steril der Frucht von *Solanum lycopersicum* entnommen wurden. 2. Fruchtfleisch von

Prunus Cerasus, das steril entnommen wurde. Entstammt, wie Nr. 1 einem Garten bei Prag. 3. Nektar, *Ajuga reptans*, Wiese bei Prag.

T. aeria (Saito) Lodder. Bierwürze sehr rasches Wachstum. Runde Zellen 3,3—5 × 4,5—6 µ. Einzeln, zu zweien und auch zu dritt. Gelegentlich kurze Sproßverbände. Kräftiger Bodensatz. Auf Bierwürzeagar die gleiche Zellgestalt. Glänzende, weiße, glatte Lager, Rand glatt. Wachstum auf Glucose- und Saccharoselösungen sehr gut, aber keine Gärung. Chinasäureagar läßt rasch glänzende, schleimige Lager entstehen. Fast keine Verfärbung tritt ein. Sporenbildung auf Gipsblöcken, Kartoffelscheiben erfolgt nicht. Stamm 2 fällt durch die langen Sproßverbände auf. Stamm 3 zeigt auf Bierwürzeagar nach längerer Kulturdauer einen rosa Farbenton. In älteren Zellen erfolgt ganz allgemein Ablagerung von Öltropfen.

Diese Form wurde isoliert. 1. Nektar, *Trifolium repens*, Wiese bei Prag. 2. Nektar, *Epilobium angustifolium*, Waldlichtung bei Prag.

T. candida (Saito) Lodder. Zellgestalt in Bierwürze rund bis oval; einzeln oder zu zweien. Bodensatz. Vergleiche *Lodder*. Bierwürzeagar ein weiß-gelber Schleim: die rundlichen Zellen sind 3—4 × 5—7 µ groß. Ältere Zellen weisen Fetteinschlüsse auf. Chinasäureagar läßt langsames Wachstum zu; gelber bis brauner Belag. Das Substrat wird braun verfärbt. Gipsblöcke, Kartoffelscheiben zeigen keine Sporenbildung.

Diese Hefe wurde aus der Blüte und dem Nektar von *Sinapis arvensis* isoliert.

Familie Dematiaceae.

Alternaria tenuis Neer. Auf Bierwürzeagar werden die bekannten schwarz-grünen, wolligen Lager gebildet. Die typischen, länglichen, gekammerten Konidien treten in großen Mengen auf. Auf Chinasäureagar entstehen rasch schwarzgrüne, eingesenkte Lager; Luftmycel wird allmählich gebildet. Das Substrat wird schwach grün getönt. Die Hyphen des eingesenkten Mycels speichern stets Öltropfen. Auf Sulfitcellulose dichte, wollige Decken; starke Konidienabsonderung. Holzschliff wird abgelehnt. Auf Glucose- und Saccharoselösungen werden dichte grüngraue Decken mit reichlicher Konidienabsonderung gebildet. Gärung tritt nicht ein. *Gäumann* reiht diese Konidienform bei der höheren Fruchtform *Pleospora* in der Ordnung der *Myringiales* ein. Wir erzielten nie eine höhere Fruchtform; so erfolgt die Abhandlung bei den *Fungi imperfecti*.

Aus dem Nektar von *Epilobium augustifolium*, Waldlichtung bei Prag, isoliert; ferner aus dem steril geöffneten Fruchtfleisch von *Solanum lycopersicum*, Garten bei Prag.

Macrosporium commune Rabenhorst. Das Wachstumsbild auf Bierwürzeagar ist dem von *Alternaria tenuis* recht ähnlich. Dichtes, wolliges

Luftmycel und eingesenkte schwarze Lager. Die Konidien sind aber viel derber und breiter; die mauerartige Unterteilung fällt wieder auf. In jeder Kammer ist gewöhnlich ein Fetttropfen. In Bierwürzelösung, ebenso in Hefewasser entstehen rasch weißgraue Decken, die dann von dem dunklen Konidienrasen überdeckt werden. Chinasäureagar ermöglicht ein rasches Wachstum; zunächst sind schwarze, eingesenkte Lager zu nennen, darüber wird ein grauschwarzes Luftmycel geformt. Glucose sowie Saccharoselösungen gestatten gute Entwicklung; Gärung tritt nicht ein. Die Hyphen des eingesenkten Mycels weisen gewöhnlich zahlreiche Öltropfen auf.

1. Nektar, *Echium vulgare*, Moldauufer bei Prag. 2. Nektar, *Sinapis arvensis*, Feld bei Prag. 3. Nektar, *Epilobium augustifolium*, Waldlichtung bei Prag. 4. Nektar, *Salvia pratensis*, Wiese bei Prag. 5. Nektar, *Malva hispida*. Botanischer Garten bei Prag. 6. Samen, steril der Frucht entnommen, und zwar von *Epilobium augustifolium*, *Rhinanthus minor*, *Raphanus Raphanistrum*. Alle auf Wiesen in der Umgegend von Prag gesammelt.

Familie Tuberculariaceae.

Aus dieser Familie wurde die Gattung *Fusarium* wiederholt isoliert.

Aus dem Nektar von *Vicia sativa* züchteten wir *F. dimerum Penz*, das auf Bierwürzeagar einen roten, schleimigen Belag und darüber ein leichtes, wolliges Luftmycel formt. Auf Chinasäureagar rascher Aufgang; Bildung eines rosa Schleimes, darüber wolliges Mycel. Das Substrat bleibt hell. Gutes Wachstum auf Glucose- und Saccharoselösungen. Gärkraft fehlt. Auf Sulfitcellulose gute Wachstumsmöglichkeit.

F. sambucinum Fuck. (*Sacc.*) wurde häufig von der Testa unterschiedlicher Samen, so Rheinland*bohne*, *Bohne* Saxen, *Eierbohne*, *Gurke* Delikatas, *Wirsingkohl*, *Wiener Frühe*. alle Versuchsfeld, Pflanzenbau, Tetschen-Liebwerd, isoliert. Dieser Pilz siedelte sich auch bei dem Keimversuch auf der entleerten Schale an. *Penicillium expansum* drängt seine Entwicklung zurück. Typisch ist das weiße, rosa bis braune Luftmycel auf Bierwürzeagar. Chinasäureagar gestattet rasche Entwicklung. Rote, eingesenkte Lager, darüber weißes Luftmycel. Das Substrat wird langsam rot getönt. Glucose- und Saccharoselösungen gestatten gute Entwicklung; Gärung tritt nicht ein.

F. equiseti (*Cda*) *Sacc.* wurde aus der Blüte von *Arnica montana*, Garten, Prag, isoliert. Die von *Wollenweber* beschriebenen Merkmale. Auf Chinasäureagar Wachstum. Roter Schleim, leichtes, helles Luftmycel. Glucose- sowie Saccharoselösungen ermöglichen gutes Wachstum. Gärung tritt nicht ein.

F. bulbigenum Cke Mass, wurde an Samen von *Raphanus Raphanistrum*, die steril der Frucht entnommen, gefunden. Ferner aus dem Nektar von *Ribes rubrum*, Garten, Prag. Auf Bierwürzeagar ist auf die blauen Farbentöne im Luftmycel hinzuweisen. Chinasäureagar zeigt ein helles Luftmycel über einem roten Schleim. Das Substrat wird grünlich getönt. Glucose- und Saccharoselösungen lassen nur submerses Wachstum zu; Gärung tritt nicht ein. Auf Sulfitcellulose rötliche Schleime.

F. oxysporum Schlechtendahl. Diese Art wurde von Samen der *Glycine Soja* und *Lupinus albus,* die steril den Hülsen entnommen wurden, isoliert. Beim Keimversuch entwickelt es sich auf der Testa des entleerten Samens. Allmähliches Zurückdrängen durch *Penicillium expansum.* Auf Bierwürzeagar ein rötlicher oder lila Schleim, darüber Luftmycel. Chinasäureagar gestattet gutes Wachstum; roter Schleim von einem Luftmycel überdeckt. In Zuckerlösungen submerses Wachstum; keine Gärung.

Ergebnisse der Untersuchungen.

Im Blütennektar sind zahlreiche Pilze zu finden, die in die Ordnung *Exoascales* und die Gruppe der *anaskosporogenen Hefen* zu stellen sind. Die seinerzeit von *Hautmann* und *Zinkernagel* isolierten Formen gehören ebenfalls in diese Gruppen. Gewöhnlich ist Vergesellschaftung mit einem Vertreter der sogenannten Schwärzepilze gegeben, wie *Dematium pullulans, Cladosporium herbarum, Alternaria tenuis* oder *Macrosporium commune.* Gelegentlich sind auch Angehörige der Gattungen *Penicillium* und *Fusarium* zu finden.

Im Innern mancher fleischiger Früchte und an Samen, die der Frucht steril entnommen wurden, befinden sich einzelne pilzliche Mikroben. Aus diesen Versuchsergebnissen kann nun geschlossen werden, daß das Innere der Früchte und die darin befindlichen Samen nicht immer keimfrei sein müssen. *A. Romwalter* gibt desgleichen für das Innere unbeschädigter Früchte Vorhandensein von Hefen und Bakterien an. Damit ist naturgemäß nicht gesagt, daß es nicht auch Fälle gibt, in denen Fruchtfleisch und Samen steril sind (vgl. *K. Rippel*).

Frisch ihrem natürlichen Standort entnommene Samen führen *an* und *in* der Testa verschiedene mikroskopische Pilze. Sehr verbreitet ist die Gattung *Penicillium.* Meist sind es ähnliche Formen, wie wir sie auch im Erdreich erkannten. Im Kern des Samens fanden wir diesmal keine mikroskopischen Pilze.

Das Wachstum der isolierten Pilze wurde verfolgt. Die von *Perwoznansky* zusammengestellte Chinasäurelösung eignet sich für die meisten isolierten Pilze sehr gut. Die Annahme, daß vor allem Pilze, denen das Vermögen der Alkoholbildung abgeht, hier gedeihen, kann nicht streng aufrechterhalten bleiben. Manche Hefen, denen Gärkraft zukommt, gedeihen hier. Richtig ist, daß mikroskopische Pilze, denen die Fähigkeit der Alkoholbildung völlig abgeht, hier besonders rasch und kräftig gedeihen. Die Verfärbung des Substrats nach grün oder schwarz ist unter diesen Bedingungen deutlich. Bei *Dematium pullulans* ist auf das sehr verschiedenartige Wachstumsbild hinzuweisen. Gärkraft geht allen isolierten Stämmen ab. In älteren Hefezellen (Dauerzellen) und Fäden der Schwärzepilze ist Ablagerung von Öltropfen zu

verzeichnen. Viele der von den Samen isolierten mikroskopischen Pilze sind durch vorzügliche Wachstumsmöglichkeit auf Cellulose und Holzstoff ausgezeichnet. Hefen, obgleich sie von *Melin* und *Rennerfelt* oft aus diesen Medien isoliert wurden, versagen hier.

Literatur.

Bauer, R., Centralbl. f. Bakt. II, 98, 133, 1938. — *Gäumann, E.*, Vergleichende Morphologie der Pilze. Jena, Fischer, 1926. — *Grüss, I.*, Jahrb. f. wiss. Bot. **66**, 109, 1937. — *Hautmann, F.*, Arch. Protistenkde. 48, 213, 1924. — *Henneberg, W.*, Handbuch der Gärungsbakteriologie. Berlin, Parey, 1926. — *Lodder, J.*, Die Hefesammlung des Centraal-Bureau voor Schimmelcultures. II. Teil: Die Anaskosporogenen Hefen. 1. Hälfte 1934. — *Melin, E.*, diese Zeitschr. **4**, 508, 1930. — *Niethammer, A.*, ebenda **10**, 13, 1939; **12**, 312, 1941. — *Perwoznansky, W. W.*, Centralbl. f. Bakt. II, 81, 372, 1930. — *Rennerfelt, E.*, diese Zeitschr. **12**, 19, 1941. — *Rippel, K.*, Planta **30**, 806, 1940. — *Romwalter, A. d. Ält.*, u. *A. von Király*, diese Zeitschr. **10**, 87, 1939. — *Sopp, O. Johan Olsen*, Monographie der Pilzgruppe Penicillium. Videnskapselkapets, Skriften math. naturw. Kl. 1912, Nr. 11. — *Thom, C.*, The Penicillia London. Baillière Tindal. Cor. 1930. — *Wagner, F.*, Centralbl. f. Bakt. 75, 4, 1928. — *Windisch, S.*, diese Zeitschr. **11**, 368, 1940. — *Zinkernagel, H.*, Centralbl. f. Bakt. 78, 191, 1929.

(Aus der Mikrobiologischen Abteilung des Instituts für Biochemie und Nahrungsmittelchemie der deutschen Technischen Hochschule, Prag.)

Weitere Beiträge über mikroskopische Bodenpilze.

Von

A. Niethammer.

(Eingegangen am 1. April 1942.)

Zweck der Arbeit und Angabe der Methodik.

Ziel der folgenden Studie war es, ein kleines Gebiet im westlichen Sudetenland genau durchzuarbeiten. Es interessierten folgende Punkte: 1. Regelmäßige Gemeinschaften bestimmter Pilze. 2. Bei der Anzucht der Mikroorganismen wurden in manchen Fällen neben den üblichen Temperaturen von 20 bis 23° auch solche von 30 bis 32° geprüft. 3. In einzelnen Böden wurde die Gemeinschaft von Pilzen und Bakterien verfolgt. 4. Das Verhalten der Pilze gegenüber Cellulose wurde betrachtet; dies interessierte besonders dort, wo der Versuch lehrte, daß wenig Bakterien, und vor allem keine zum Celluloseabbau befähigte, vorhanden waren. 5. Mikroskopische Pilze aus Mooren wurden studiert; der Abbau der Cellulose durch dieselben erscheint hier wichtig. 6. Eine nicht mehr im Betrieb stehende, an Schwefel reiche Bergwerkhalde wurde untersucht.

Die Methodik war die gleiche wie in den früheren Arbeiten. Die Rohkulturen für Pilze wurden auf Bierwürzeagar und diejenigen für Bakterien auf Fleischpeptonagar ausgeführt; im Texte gebrauchen wir die Namen Nährboden 1 und 2. Die Petrischalen fanden in Brutschränken bei 20 bis 23° und 30 bis 32° Aufstellung. Für die Reinkultur sowie Bestimmung dienten die ebenfalls früher erwähnten Spezial-Nährböden. Die Wachstumsmöglichkeit auf Cellulose wurde auf technischer Sulfitcellulose verfolgt; dieselbe wurde für Pilze wieder mit einer sauren nach *Stapp* bereiteten Nährlösung befeuchtet. Für Bakterien wurde die von *Viljoen* und Mitarbeitern genutzte Nährlösung mit einem p_H 7 genutzt.

Versuchsergebnisse.

Die einzelnen Bodenarten werden aufgezählt und die isolierten Mikroben beschrieben. Die Durcharbeitung der oben angegebenen Punkte erfolgt in diesem Rahmen. Dort, wo in der Beschreibung auf frühere Arbeiten hingewiesen wird, unterbleibt dieselbe. Bei den einzelnen Bodenarten, in denen die gleichen Mikroorganismen immer wieder auftreten, ist die erste Isolierung zu vergleichen. Auf die Bakteriengruppe eines engeren Gebietes im Zusammenhang mit den mikroskopischen Pilzen hat *Janke* mit seinen Mitarbeitern hingewiesen. Auf

die dort niedergelegten Ergebnisse gehen wir im Zusammenhang mit unseren Versuchsbesprechungen ein. Untersuchungen von Moorböden in der Po-Gegend lassen nach *Verona* ein starkes Zurücktreten der Pilze gegenüber den Bakterien erkennen.

Moorböden.

Aus dem Moor Soos bei Franzensbad wurden mehrere Proben bezogen.

Probe Nr.	20—23° C	30—32° C
	Nährboden 1.	
1	*Fusarium oxysporum Schlechtend.* *Penicillium lanosum Westling* *Cladosporium herbarum Pers.*	*Aspergillus fumigatus Thom*
	Nährboden 2.	
	Bac. subtilis (Ehrenberg) Cohn.	Die gleiche Form
	Nährboden 1.	
2	*Fusarium orthoceras Wollenw. App.*	*Aspergillus glaucus Link.*
	Nährboden 2.	
	Bac. vulgatus Flügge, Migula	Die gleiche Form
	Nährboden 1.	
3	*Penicillium affinis Bainier-Sartory* *Rhodotorula glutinis (Fres.) Harrison*	*Aspergillus fumigatus Thom*
	Nährboden 2.	
	Bac. subtilis (Ehrenberg) Cohn *Bact. fluorescens Lehm.-Neum.*	*Bac. subtilis (Ehrenberg) Cohn*
	Nährboden 1.	
4	*Cladosporium herbarum Pers.* *Fusarium dimerum Penz.* *Mucor hiemalis Wehmer*	*Penicillium affinis B.*u.*S.*
	Nährboden 2.	
	Actinomyces ruber Strainsky-Waksman *Bac. mesentericus (Flügge) L. N.* *Bac. mycoides Flügge* *Actinomyceten*, nicht näher bestimmt	*Bac. mycoides Flügge* *Bac. megaterium de Bary*
	Nährboden 1.	
5	*Rhizopus nigricans Ehrenberg* *Fusarium dimerum Penz* *Penicillium luteum Zukal*	*Trichoderma Koningi Oud.*
	Nährboden 2.	
	Bac. subtilis (Ehrenberg) Cohn	Dieselbe Form
	Nährboden 1.	
6	*Fusarium oxysporum Schlechtend.* *Penicillium luteum Zukal*	*Dematium pullulans de Bary* *Penicillium luteum Z.*

Probe Nr.	20—23° C	30—32° C
	Nährboden 2.	
	Bact. prodigiosum (Ehrenberg) Lehm.-Neum.	Dieselbe Form, aber farblos
	Nährboden 1.	
7	*Fusarium merismoides var. chlamydosporum Wr.* *Penicillium elegans Corda* *Trichoderma Koningi Oud.* *Mucor hiemalis Wehmer* *Cladosporium herbarum Pers.*	*Fusarium merismoides var. chlamydosporum Wr.*
	Nährboden 2.	
	Bac. megaterium de Bary	Dieselbe Form
	Nährboden 1.	
8	*Fusarium equiseti (Cda) sacc.* *Cladosporium herbarum Pers.* *Trichoderma Koningi Oud.* *Penicillium luteum Zukal* „ *affinis Wehmer*	*Aspergillus fumigatus Thom*
	Nährboden 2.	
	Bact. Zopfii Kurth, nicht näher bestimmte *Actinomyceten* *Bact. fluorescens Lehm.-N.*	*Bac. megaterium de Bary*
	Nährboden 1.	
9	*Mucor hiemalis Wehmer* *Penicillium glaber Wehmer* *Penicillium luteum Zukal* *Fusarium oxysporum Schlechtend*	*Aspergillus fumigatus Thom* *Trichoderma Koningi Oud.*
	Nährboden 2.	
	Keine Bakterien, nur *Pilze*	Das gleiche Ergebnis

Diese neun Proben können gemeinsam behandelt werden. Dem sauren Charakter der Moorböden entsprechend sind die *Pilze* mannigfacher vertreten als die *Bakterien*. Aerobe und anaerobe Cellulose abbauende Bakterien wurden hier nicht isoliert, ebensowenig termophile Bakterien. Die meisten hier genommenen Pilze, besonders *Fusarium*-Arten und *Trichoderma Koningi* sind zu sehr gutem Wachstum auf Cellulose befähigt. Die *Penicillium*-Arten bilden Decken, wogegen die *Fusarium*-Arten in dem Substrat wuchern und dasselbe unter mannigfacher Verfärbung erweichen.

Für den Aufgang bestimmter Pilzarten in der Kultur ist die Temperatur maßgebend.' *Aspergillus*-Arten bevorzugen meist höhere Temperatur.

Unter physiologischen Eigentümlichkeiten ist bei diesen Proben manches zu beachten. *Penicillium*-Arten gedeihen auch bei 30 bis 36°;

die Konidienbildung wird stark zurückgedrängt. Die meisten aus diesem Moorgebiet isolierten mikroskopischen Pilze weisen in ihren Hyphen deutliche Fettspeicherung auf. Besonders beträchtlich ist dieselbe bei *P. affinis* und vor allem in flüssigen Medien. Die von *Pervozwansky* eingeführte Chinasäurelösung mit 2 % Agar-Agar wird von den meisten Pilzen besiedelt. *P. glaber* fällt durch die reichliche Absonderung von Kristallformen, welche an Calciumoxalat erinnern, auf, und zwar auf allen Nährböden. Die isolierten *Mucorineen* sind durchwegs durch eine kräftige Absonderung von Öltropfen in den Hyphen, Gemmen, Dauerzellen sowie Kugelzellen ausgezeichnet; ähnliches gilt für die *Fusarium*-Arten. *Bact. prodigiosum* zeigt nur bei Temperaturen unter 26° die typische rote Farbstoffbildung; bei höheren Temperaturen wächst er in hellen Lagern. Cellulosestreifen mit *Viljoen*-Lösung besiedelt er gerne, ein deutlicher Abbau der Masse tritt aber nicht ein. Die isolierten Stämme von *Trichoderma Koningi* sind durch das Vermögen eines guten Celluloseabbaues und angenehmen Geruch ausgezeichnet.

Ein zweiter Moorboden stand uns von Sebastiansberg-Erzgebirge zur Verfügung. Auf Nährboden 1 und 2 entwickeln sich bei beiden Temperaturgefällen die gleichen Formen, und zwar *Penicillium glaber Wehmer*, *Monilia nigra Burri-Staub*, *Dematium pullulans de Bary*. Nährboden 2 läßt keine Bakterien aufkommen. Versuche mit Cellulosestreifen und Viljoen-Losung bringen *Cellvibrio fulva Stapp*, einen aeroben Cellulose-Zersetzer zur Entwicklung. Der Abbau der Cellulose durch diesen Organismus bei 26 und 32° C ist gering. *Janke* beschreibt bei seinen Untersuchungen in Lunz *Bac. vulgatus*, *mycoides*, *mesentericus*, *Bact. fluorescens* als häufig.

Feldbestände.

Feldbestände bei Haid und Pfraumberg im Bezirke Tachau wurden genau untersucht.

In den verschiedenen Feldbeständen werden die typischen Bodenpilze erkannt; in den unterschiedlichen Pflanzenbeständen treten immer wieder ähnliche Formen auf. Nahezu jeder Feldbestand liefert reichlich *Actinomyceten*; im Durchschnitt 100000 Kolonien auf 1 g Erde. Sie sind durch sehr gutes Wachstum auf Fleisch-Peptonagar ausgezeichnet. Temperaturen von 20 bis 22° werden bevorzugt. Unter den *Bakterien* ist wieder auf ähnliche Formen hinzuweisen, wie sie *Janke* als für Bodenarten sehr typisch angibt. *Bac. vulgatus* wurde von *Werner* desgleichen aus dem Boden isoliert und für den Abbau von Buttersäure als wichtig erkannt. Bei der niedrigeren Temperatur kommen im Durchschnitt *mehr Arten* von *Pilzen* und *Bakterien* auf; die höhere Temperatur begünstigt meist die Entwicklung *einer Art*. Die Gattungen *Penicillium* und *Dematium* schreiten besonders bei hoher Temperatur zur Perithecienbildung. Bei den verschiedenen Arten von *Penicillium* werden

Flachsfeld.

Probe Nr.	20—23° C	30—32° C
	Nährboden 1.	
1	*Fusarium merismoides Cda* *Verticillium glaucum Bon.* *Penicillium bicolor Fries* *Penicillium luteum Zukal* *Zygorrhynchus Moelleri V.* *Rhodotorula glutinis Harris* *Trichoderma Koningi Oud.*	*P. luteum Z.* mit vielen fertilen Sklerotien *Mucor silvaticus Hagem*
	Nährboden 2.	
	Nicht näher bestimmte *Actinomyceten* *Bac. subtilis (Ehrenberg) Cohn* *Bact. Zopfii Kurth* *Micrococcus flavus Lehm.-N.* *Micrococcus bicolor Zimmermann* *Bac. vulgatus Flügge-Migula* *Bact. tumescens Zopf.* *Bac. mycoides Flügge* *Bac. megaterium de Bary* *Bac. graveolens Meyer-Gottheil*	Nicht näher bestimmte *Actinomyceten* *Bac. mycoides Flügge*
	Auf Cellulose-Streifen mit *Viljoen*-Lösung tritt bei 24 bis 25° starke Gärung ein; ebenso bei 37°.	
	Nährboden 1.	
2	*Zygorrhynchus Moelleri Vuill.* *Penicillium luteum Zukal* *Trichoderma Koningi Oud.* *Rhodotorula glutinis (Fres.) Harrison* *Fusarium merismoides Cda.*	*Penicillium luteum Zukal,* viel sterile Sklerotien
	Nährboden 2.	
	Nicht näher bestimmte *Actinomyceten* *Micrococcus flavus Lehm.-N.* *Bac. mesentericus (Flügge) Lehm.-Neum.* *Bact. coli Escherich* *Bac. subtilis (Ehrenberg) Cohn*	Nicht näher bestimmte *Actinomyceten* *Bac. subtilis (Ehrenberg) Cohn*
	Bei 25° und 37° *langsam* Vergärung von Cellulose-Streifen.	

Roggenfeld.

Probe Nr.	20—23° C	30—32° C
	Nährboden 1.	
1	*Mucor hiemalis Wehmer* *Penicillium bicolor Fries* *Penicillium glaber Wehmer* *Trichoderma Koningi Oud.* *Dematium pullulans de Bary* *Fusarium Poae (Ph.) Sacc.*	*Aspergillus fumigatus Thom* *Fusarium reticulatum Montagne* *P. luteum Z.*

Nr. Probe	20—23° C	30—32° C
	Nährboden 2.	
	Sehr viele, nicht genau bestimmte *Actinomyceten* *Bac. subtilis (Ehrenberg) Cohn* *Bac. mesentericus (Flügge) Lehm.-Neum.*	*Bac. subtilis (E.) Cohn*
	Nährboden 1.	
2	*Mucor hiemalis Wehmer* *Penicillium luteum Zukal* *Trichoderma Koningi Oud.* *Cladosporium herbarum Pers.* *Fusarium avenaceum (Fr.) Sacc.*	*P. bicolor Fries*
	Nährboden 2.	
	Viele nicht näher bestimmte *Actinomyceten* *Bac. subtilis (Ehrenberg) Cohn*	*Bac. subtilis (E.) Cohn* *Cellvibrio fulva Stapp*

Auf Cellulose-Streifen mit *Viljoen*-Lösung entwickelt sich bei 27 bis 29° *Cellvibrio fulva.* Unter diesen Bedingungen auch bei 36 bis 37° starke Vergärung von Cellulose.

Kartoffelfeld.

Nr. Probe	20—23° C	36—32° C
	Nährboden 1.	
1	*Mucor hiemalis Wehmer* *Trichoderma Koningi Oud.* *Cladosporium herbarum Pers.*	*Pen. luteum Zukal,* Perithezien
	Nährboden 2.	
	Viele nicht näher bestimmte *Actinomyceten* *Bac. mycoides Flügge*	*Bac. subtilis (E.) Cohn*
2	Das gleiche Ergebnis wie Probe 1.	

Gerstenfeld.

Probe Nr.	20—23° C	30—32° C
	Nährboden 1.	
1	*Penicillium luteum Zukal* *Cladosporium herbarum Pers.*	*Penicillium bicolor Fries* *Dematium pullulans de Bary,* mit Perithecien
	Nährboden 2.	
	Verschiedene, nicht näher bestimmte *Actinomyceten* *Bac. subtilis (E.) Cohn*	*Bac. subtilis (E.) Cohn*

Probe Nr.	20—23° C	30—32° C
	Nährboden 1.	
2	*Mucor hiemalis Wehmer* *Dematium pullulans de Bary* *Fusarium oxysporum Schlechtend.* *Trichoderma Koningi Oud.*	*Aspergillus fumigatus Thom* *Dematium pullulans de Bary*, Perithecien
	Nährboden 2.	
	Verschiedene, nicht näher bestimmte *Actinomyceten*	*Bac. subtilis (E.) Cohn*

Auf Cellulose-Streifen, welche mit *Viljoen*-Lösung angefeuchtet sind, entwickelt sich bei 24 bis 25° *Cellvibrio fulva*.

Weizenfeld.

Probe Nr.	20—22° C	30—32° C
	Nährboden 1.	
1	*Zygorrhynchus Moelleri Vuill.* *Mucor silvaticus Hagem* *Penicillium purpurogenum Stoll*, Sklerotien *Dematium pullulans de Bary* *Trichoderma Koningi Oud.* *Fusarium semitectum Berg.* u. *Rav.* *Fusarium orthoceras Wr. App.*	*Penicillium purpurogenum Stoll* *Trichoderma Koningi Oud.*
	Nährboden 2.	
	Bac. mesentericus (Flügge) Lehm.-Neum. *Bac. Ellenbachensis Stutzer* *Actinomyces odorifer*	*Bac. mesentericus (Flügge) Lehm.-Neum.*

Cellulose-Streifen mit *Viljoen*-Lösung befeuchtet, aerobe Cellulose-Abbauer.

Probe Nr.	20—22° C	30—32° C
	Nährboden 1.	
2	*Mucor hiemalis Wehmer* *Dematium pullulans de Bary* *Trichoderma Koningi Oud.*	*Rhizopus arrhizus Fischer*
	Nährboden 2.	
	Nicht näher bestimmte *Actinomyceten* *Bac. vulgatus Migula* *Bact. Zopfii Kurth*	*Bact. Zopfii Kurth*

Auf Cellulose-Streifen mit *Viljoen*-Lösung befeuchtet verschiedene aerobe Cellulose-Bakterien.

Weizenfeld.

Probe Nr.	20—22° C	30—32° C
	Nährboden 1.	
1	*Dematium pullulans de Bary* *Fusarium sambucinum Fuck.*	*Dematium pullulans de Bary*, Perithecien

Probe Nr.	20—22° C	30—32° C
	Nährboden 2.	
	Bac. mesentericus (Flügge) Lehm.-Neum. Nicht näher bestimmte *Actinomyceten*	*Bac. mesentericus (Flügge) Lehm.-Neum.*
	Auf Cellulose-Streifen tritt bei 25° sowie 37° unter aeroben Bedingungen deutliche, aber langsame Gärung ein.	
	Nährboden 1.	
2	*Verticillium glaucum Bon.* *Fusarium sambucinum Fuck.*	*Penicillium luteum Zukal*, Perithecien *Aspergillus fumigatus Thom*
	Nährboden 2.	
	Nicht näher bestimmte *Actinomyceten* *Bac. mesentericus (Flügge) Lehm.-Neum.* *Bac. Ellenbachensis Stutzer*	*Bac. mesentericus (Flügge) Lehm.-Neum.*
	Bezüglich der Cellulose-Gärung gilt das oben Gesagte.	

Zuckerrübenfeld.

Probe Nr.	20—22° C	30—32° C
	Nährboden 1.	
1	*Mucor hiemalis Wehmer* *Penicillium glaber Wehmer* mit rötlichen Sklerotien *Cladosporium herbarum Pers.* *Fusarium merismoides Cda.* *Fusarium culmorum (W. b. Sm.) Sacc.*	*Aspergillus glaucus Link* *Rhizopus arrhizus Fischer*
	Nährboden 2.	
	Bac. mesentercius (Flügge) Lehm.-Neum. *Bac. megaterium de Bary* *Bac. subtilis (E.) Cohn* Verschiedene nicht näher bestimmte *Actinomyceten*	*Bac. subtilis (E.) Cohn*

Unterschiedliche Cellulose-Vergärer sind bei 25° sowie 37° vorhanden; sie arbeiten langsam. Bestimmt wurde nur *Cellvibrio fulva.*

Die zweite Probe zeigt ein so übereinstimmendes Ergebnis, daß keine Beschreibung erfolgt.

Rotkleefeld.

Probe Nr.	20—23° C	30—32° C
	Nährboden 1.	
1	*Mucor hiemalis Wehmer* *Dematium pullulans de Bary* *Fusarium nivale (Fr.) Ces.* *Fusarium arthosporicides Sherp.*	*Penicillium bicolor Fries.* *Trichoderma Koningi Oud.*

Probe Nr.	20—22° C	30—32° C
	Nährboden 2.	
	Nicht näher bestimmte *Actinomyceten* *Bac. megaterium de Bary*	*Bac. subtilis (E.) Cohn*
	Nährboden 1.	
2	*Mucor hiemalis Wehmer*, reichlich Zygoten *Zygorrhynchus Moelleri Vuill.* *Cladosporium herbarum Pers.* *Trichoderma Koningi Oud.* *Fusarium reticulatum Mont. f. l. Wr.*	*Trichoderma Koningi Oud.*
	Nährboden 2.	
	Nicht näher bestimmte *Actinomyceten* *Bac. megaterium de Bary*	*Bac. subtilis (E.) Cohn*

In beiden Proben tritt bei 25° und 37° Vergärung von Cellulose ein; eine Bestimmung der Arten erfolgt nicht.

immer sehr ähnliche oder übereinstimmende Perithecien gebildet; dieser Umstand spricht wieder für eine nahe Verwandtschaft.

Die *Mucorineen* speichern durchwegs Öltropfen. Bei *Mucor hiemalis* ist sie im Zusammenhang mit der Zygotenbildung sehr stark (*Schopfer*). Die *Fusarium*-Arten lagern in Hyphen, Chlamydosporen und rundlichen Dauerzellen ebenfalls Öltropfen ab. Die Vertreter der Gattungen *Penicillium*, *Dematium*, *Cladosporium*, *Trichoderma* und *Fusarium* zeigen auf Cellulosestreifen gute Entwicklung. Die aus den Mooren isolierten Formen arbeiteten kräftiger. Bei den meisten Proben wurde auch auf die Anwesenheit von aeroben zum Celluloseabbau befähigten *Bakterien* geprüft; diese Probe fiel stets positiv aus. Auf anaerobe Formen wurde nur selten eingegangen, daher unterblieb auch bei der Aufzählung ihre Erwähnung. Soweit wir Isolierungen anstellten, arbeiteten die gewonnenen Stämme schwach.

Krautfeld.

Im November 1941 wurden in einem abgeernteten Krautfeld unweit Prags einige Proben gezogen.

Nährboden 1.

20—23° C	30—32° C
Mucor hiemalis Wehmer *Dematium pullulans de Bary* *Fusarium oxysporum Schlechtend.* *Synsporium bigutattum* *Rhodotorula glutinis Harrison*	*Aspergillus fumigatus Thom*

Nährboden 2.

20—22° C	32—34° C
Bact. prodigiosum Viele nicht näher bestimmte *Actinomyceten*	*Bac. subtilis (E.) Cohn*

Cellulosestreifen, welche mit *Viljoen*-Lösung getränkt waren, ließen neben *Fusarium oxysporum*, welches hier reichlich Chlamydosporen bildet, *Cytophaga Hutchinsonii* entwickeln. Dieselbe bedingt eine Gelbfärbung der Cellulose; zunächst tritt Erweichung und allmählich Zersetzung ein.

Nasse Wiesen.

Einzelne sehr nasse Wiesen in der Tachauer Gegend wurden ebenfalls in das Untersuchungsbereich einbezogen.

Probe Nr.	20—22° C	30—32° C
	Nährboden 1.	
1	*Penicillium luteum Zukal*, mit rosa und gelben Sklerotien *Fusarium sambucinum Fuck.* *Cladosporium herbarum Pers.* *Trichoderma Koningi Oud.* sehr angenehmer Geruch	*Aspergillus fumigatus Thom*
	Nährboden 2.	
	Bac. megaterinum de Bary	*Bac. subtilis (E.) Cohn*
	Nährboden 1.	
2	*Mucor racemosus Fres.* *Penicillium affinis B. u. S.* *Cladosporium herbarum Pers.* *Fusarium nivale (Fr.) Ces.* *Fusarium merismoides Cda.*	*Penicillium affinis B.* u. *S.*
	Nährboden 2.	
	Sehr viele nicht näher bestimmte *Actinomyceten*, auf diesen Lagern entwickelt sich deutlich *Cellvibrio fulva*	*Bac. subtilis (E.) Cohn*
	Nährboden 1.	
3	*Penicillium luteum Zukal*, viele Sklerotien *Trichoderma Koningi Oud.* *Fusarium orthoceras Wr. App.*	*P. luteum Z.*, fertile Perithecien
	Nährboden 2.	
	Sehr viele nicht näher bestimmte *Actinomyceten*, darüber wieder *Cellvibrio fulva* *Bact. fluorescens (Flügge) L.-N.* *Bac. anthracis F. Cohn* et *Koch* *Bac. mycoides Flügge* *Bac. mesentericus (Flügge) L.-N.*	*Bac. subtilis*

Probe Nr.	20—22° C	30—32° C
	Nährboden 1.	
4	*Penicillium italicum Wehmer* *Cladosporium herbarum Pers.* *Fusarium dimerum Penz*	*Penicillium italicum Wehmer*
	Nährboden 2.	
	Bac. mesentericus (Flügge) Lehm.-Neum. Sehr viele nicht näher bestimmte *Actinomyceten*	*Bac. subtilis (E.) Cohn*

Aus allen Proben wurden aerobe sowie anaerobe Cellulose abbauende *Bakterien* zur Entwicklung gebracht. Diese Proben weisen gegenüber den Feldbeständen keinen wesentlichen Unterschied auf.

Waldböden.

Weiterhin wurde Erdreich unter Laub- und Nadelwaldungen geprüft.

Nadelwald.

Probe Nr.	20—22° C	30—32° C
	Nährboden 1.	
1	*Penicillium glaber Wehmer* *Dematium pullulans Pers.* *Trichoderma Koningi Oud.* *Fusarium oxysporum Schlechtend.*, innig verbunden mit *Zygorrhynchus Moelleri Vuill.*	*Trichoderma Koningi Oud.*
	Nährboden 2.	
	Bact. Zopfii Kurth	*Bac. subtilis (E.) Cohn*
	Nährboden 1.	
2	*Mucor racemosus Fres.* *Trichoderma Koningi Oud.* *Penicillium luteum Z.*	*Penicillium luteum Z.*
	Nährboden 2.	
	Bac. megaterium de Bary Nicht näher bestimmte *Actinomyceten* *Sarcina subflava Ravenel* *Bact. fluorescens (Flügge) Lehm.-Neum.* *Bac. anthracis J. Kohn* u. *Koch*	*Bac. subtilis (E.) Cohn*
	Nährboden 1.	
3	*Penicillium bicolor Fries*, mit sehr vielen gelben Sklerotien *Trichoderma Koningi Oud.* *Fusarium oxysporum Schlechtendahl* *Fusarium dimerum Penz*	*Pen. bicolor Fries*

Probe Nr.	20—22° C	30—32° C
	Nährboden 2.	
	Bact. fluorescens (Flügge) Lehm.-Neum. *Bac. mesentericus (Flügge) Lehm.-Neum.* Sehr viele nicht näher bestimmte *Actinomyceten*	*Bac. subtilis (E.) Cohn*
	Nährboden 1.	
4	*Zygorrhynchus Moelleri Vuill* *Penicillium bicolor Fries* *Cladosporium herbarum Pers.* *Rhodotorula corallina Harrison* *Trichoderma Koningi Oud.*, ausgezeichnet durch Wohlgeruch *Fusarium oxysporum Wr. App.*	*Penicillium bicolor Fries.*
	Nährboden 2.	
	Bact. Zopfii Kurlh. Sehr viele nicht näher bestimmte *Actinomyceten*	*Bac. megaterium de Bary*

Laubwald.

Probe Nr.	20—22° C	30—32° C
	Nährboden 1.	
1	*Mucor racemosus Fres.* *Penicillium bicolor Fries.* *Cladosporium herbarum Pers.* *Trichoderma Koningi Oud.* *Fusarium dimerum Penz.*	*Penicillium bicolor Fries* *Trichoderma Koningi Oud.*
	Nährboden 2.	
	Bact. flurescens (Flügge) Lehm.-Neum. *Bac. mesentericus (Flügge) Lehm.-Neum.* Viele nicht näher bestimmte *Actinomyceten*	*Bac. subtilis (E.) Cohn*
	Nährboden 1.	
2	*Mucor silvaticus Hagem* *Penicillium expansum Thom* *Fusarium sambucinum Fuck.* *Trichoderma Koningi Oud.*	*Trichoderma Koningi Oud.*
	Nährboden 2.	
	Es wird ein nahezu übereinstimmendes Ergebnis erzielt, wie bei Probe 1.	
	Nährboden 1.	
3	*Rhizopus nigricans Ehrenberg* *Cladosporium herbarum Pers.*, mit deutlichen Sklerotien *Penicillium bicolor Fries* *Trichoderma Koningi Oud.* *Fusarium sambucinum Fuck.*	*Penicillium bicolor Fries*
	Nährboden 2.	
	Actinomyces subflava Ravenel Viele nicht näher bestimmte *Actinomyceten*	*Bac. subtilis (C.) Ehrenberg*

Alle aus den Waldböden isolierten Proben liefern auf Cellulosestreifen mit *Viljoen*-Lösung eine reiche Menge von aeroben und anaeroben Cellulose vergärenden Bakterien. Bei Prüfung der verschiedenen mikroskopischen Pilze fiel auf, daß die hier isolierten Stämme schwach auf Cellulose gediehen und der Abbau derselben gering war. Die gemeinsam auftretenden *Mucorineen*- und *Fusarium*-Arten weisen in ihren Hyphen eine sehr kräftige Absonderung von Öltropfen auf. Unter den auf Cellulose gedeihenden *Bakterien* wurde die von *Stapp* beschriebene *Cellvibrio fulva* öfters isoliert.

Schwefelreiche Halde.

Die letzte abzuhandelnde Probe berichtet noch über eine abgebaute Halde, welche reich an Schwefel ist.

20—22° C	32—34° C
Nährboden 1.	
Zygorrhynchus Moelleri Vuill; in dessen Hyphen findet starke Fettspeicherung statt *Mucor Ramannianus Moeller*, ebenfalls durch starke Fettspeicherung ausgezeichnet *Dematium pvllulans de Bary* *Penicillium glaber Wehmer*	*Dematium pullulans de Bary*, drängt alle Pilze zurück
Nährboden 2.	
Bac. mesentericus (Flügge) Lehm.-Neum. die Kolonienzahl ist sehr gering	*Bac. subtilis (E.) Cohn*

Zusammenfassung der Ergebnisse.

Unsere Untersuchungen zeigen wieder, daß es sich bei den im Boden verbreiteten Pilzen um bestimmte Gemeinschaften handelt. Die Versuche lehrten, daß bei der Anzucht in Temperaturbereichen von 20 bis 23° zahlreichere und verschiedenartigere Mikroorganismen auftraten als zwischen 32 und 34°. Höhere Temperatur begünstigt meist die Entwicklung einer oder weniger Arten. In Übereinstimmung mit den Arbeiten von *Janke* kann gezeigt werden, daß gemeinsam mit den mikroskopischen Boden*pilzen* auch *bestimmte Bakterien*-Arten auftreten. Viele der isolierten mikroskopischen Bodenpilze gedeihen auf Cellulose sehr gut; interessant ist, daß diejenigen Pilzstämme, welche aus Böden stammen, in denen wenige zum Abbau der Cellulose befähigte Bakterien vorhanden sind, besonders gut arbeiten. In Moorgebieten fehlen Bakterien, welche zur Vergärung von Cellulose befähigt sind. Verschiedene mikroskopische Pilze aus Mooren sind zum Abbau von Cellulose gut befähigt. Die aus diesen Gebieten isolierten *Mucorineen* und *Fusarium*-Arten speichern in ihren Hyphen reichlich Öltropfen. Eine alte, nicht

mehr im Betrieb befindliche schwefelreiche Berghalde zeigt verschiedene mikroskopische *Pilze*; *Bakterien* sind nur vereinzelt vertreten. Die aus Wald- oder Feldboden isolierten mikroskopischen Pilze speichern vielfach auch Öltropfen, aber nie in dem Ausmaß, wie die aus den Moorböden. Ähnlich verhält es sich auch mit dem Abbau der Cellulose durch diese Mikroorganismen. Die Stämme aus dem Moorboden arbeiten meist kräftiger als diejenigen aus dem Waldboden und Ackerland. In Übereinstimmung mit *Okada* kann die weite Verbreitung von *Trichoderma Koningi* in fast allen Bodenarten erkannt werden. In dem Zusammenhang ist die Tatsache wieder interessant, daß nach den Erfahrungen von *Waksman* und uns dieser Pilz sehr gut auf Cellulose gedeiht und diese nach *Waksman* bis zu über 50 % abbauen kann.

Literatur.

Janke, A., u. *M. Wozak*, diese Zeitschr. **5**, 338, 1938. — *Niethammer, A.*, ebenda **12**, 312, 1941. — *Okada, J.*, Sc. Repr. Tokyo Univ. Biol. 1939, Nr. 3. — *Perwozvansky, N.*, Centralbl. f. Bakt. II, **81**, 372, 1930. — *Schopfer, W. H.*, Extrait du bulletin de la Société Botanique de Genéve, 2e série, vol. **20**, fasc. 1. — *Stapp, C.*, u. *Bortels*, Centralbl. f. Bakt. II, **90**, 28, 1934. — *Viljoen, J. A.*, *E. B. Fred* u. *W. H. Peterson*, J. of Agric. Sc. **16**, 1, 1926. — *Verona, O.*, diese Zeitschr. **5**, 348, 1934. — *Werner, W.*, Centralbl. f. Bakt. II, **87**, 446, 1933. — *Waksman, S. A.*, u. *A. Cordon*, Soil Sc. **47**, 217, 1929.

(Aus dem Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen.)

Der Einfluß steigender Gaben von Magnesiumsulfat auf den Ertrag einiger Pilze.

Von

Artur Starc.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 15. April 1942.)

In Fortsetzung der Untersuchungen, die *A. Rippel* und Mitarbeiter über das Ertragsgesetz und die Nährstoffwirkung durchgeführt haben, sind in der kürzlich erschienenen Arbeit von *W. Lohrmann* (2) einige Fragen ungeklärt geblieben. Mit Rücksicht auf die Tatsache, daß bei einigen Pilzen verhältnismäßig sehr hohe $MgSO_4$-Konzentrationen eine fördernde Wirkung ausüben, war es wichtig festzustellen, wie die verschiedenen, allmählich steigenden Gaben von Magnesiumsulfat auf den Pilzertrag wirken.

Versuchsbedingungen.

Die allgemeinen Versuchsbedingungen waren die gleichen wie bei *W. Lohrmann.*

Als Versuchsobjekte dienten *Aspergillus flavus* und *Mucor pusillus*, zwei Pilze von verschiedener Resistenz gegenüber $MgSO_4$. Die Pilze wurden auf Würze-Schrägagar kultiviert; von 3 Tage alten Kulturen wurde unter Zusatz von etwas dest. Wasser eine dichte Sporensuspension hergestellt und mit der großen Platinöse je 25 ccm Nährlösung in Erlenmeyerkölbchen von 100 ccm, geimpft.

Die Stammnährlösungen, die einen Zusatz von verschiedenen steigenden Gaben des $MgSO_4$ erhielten, waren folgende:

a) Für *Aspergillus flavus*: Dest. Wasser 1000 ccm; Saccharose 100 ccm; KH_2PO_4 5 g; KNO_3 33,5 g; NaCl, $MnSO_4$, $FeSO_4$ und Citronensäure je 0,01 g; $ZnSO_4$ 2 Tropfen 1%ige Lösung; $CuSO_4$ 1 Tropfen 1%ige Lösung.

b) Für *Mucor pusillus*: Dest. Wasser 1000 ccm; Saccharose 200 g; $(NH_4SO_4)_2$ 20 g; K_2HPO_4 1 g; Citronensäure 0,5 g; $FeSO_4$ 0,1 g; $ZnSO_4$ 0,01 g; $CuSO_4$ 0,005 g; Asparagin 0,5 g.

Die Reaktion wurde für beide Nährlösungen auf p_H 6,5 eingestellt.

Beim direkten Zusatz hoher Gaben von $MgSO_4$ als feste Substanz zur fertigen Stammnährlösung steigt das Flüssigkeitsvolumen erheblich, so daß die Prozentzahlen nicht richtig sind. In unseren ersten zwei Versuchen, bei denen wir die Nährlösung so herstellten wie *W. Lohrmann* angibt, haben wir nachträglich die wirklichen Prozentzahlen errechnet; so z. B. beim Zusatz von 50 g $MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$ ist der prozentuale Gehalt etwa 40, von 60 g $MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$ 45 und bei 70 g $MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$ nur 50.

Die geimpften Kölbchen wurden im Brutzimmer bei 30 ± 1^{0} C gehalten. Obwohl das Temperaturoptimum für die beiden Pilze bei etwa

37° C liegt, ist das Wachstum bei 30° doch noch immer üppig. Das Mycel wurde zu zwei bis drei verschiedenen Zeitpunkten, je nach der Wachstumsintensität des Pilzes, geerntet, und zwar so, daß die Pilzhäutchen auf den vorher abgewogenen Filtern quantitativ übertragen, zunächst mit schwach angesäuertem und dann mit destilliertem Wasser mehrmals ausgewaschen wurden. Die Mycelien wurden einige Tage bei 35 bis 40° im Brutzimmer, dann über Nacht im Trockenschrank bei 100° getrocknet und endlich gewogen. Die Ergebnisse beziehen sich auf die abs. Trockensubstanz und stellen den Durchschnitt von 3 bis 4 Parallelen; die wahrscheinliche Schwankung des Mittels ist hinzugefügt.

Die Zuckerbestimmung wurde nach *Bertrand* durchgeführt. Da größere Mengen von $MgSO_4$ störend auf die Bestimmung wirken — es bildet sich ein voluminöser Niederschlag von $Mg(OH)_2$ —, wurde das $MgSO_4$ aus den Proben als $MgNH_4PO_4$ beseitigt und der Zucker im Filtrat bestimmt. Um zuverlässige Ergebnisse zu erhalten, wurde die Zuckerbestimmung gleichfalls auch in den Kontrollen mit verschiedenen $MgSO_4$-Gaben durchgeführt.

Der Aschegehalt ist durch Veraschung der fein zerriebenen Pilzmasse, die Reaktion mit Lyphanstreifen in Lösungen nach der einzelnen Ernte bestimmt.

Versuchsergebnisse.

Versuch I.

Die Ergebnisse des Versuchs sind in den Tabellen I und II angeführt. Dazu sind noch einige Bemerkungen über das Aussehen der Myceldecke und die mikroskopische Kontrolle zu erwähnen.

Aspergillus flavus: In der Nährlösung tritt schon am zweiten Tage ein weißes Häutchen auf, das sich nach einiger Zeit mit gelbgrünen Sporen bedeckt. Während der ersten Ernte (nach 4 Tagen) befindet

Tabelle I. *Aspergillus flavus.*

$MgSO_4$	Nach 4 Tagen		Nach 11 Tagen	
%	Mycelgewicht	p_H	Mycelgewicht	p_H
0,00	27 ± 3	6,7	45 ± 12	6,3
0,01	225 ± 7	6,9	378 ± 3	7,0
0,025	271 ± 4	7,1	581 ± 20	7,2
0,05	342 ± 9	7,2	647 ± 10	7,6
0,10	322 ± 36	7,1	663 ± 2	7,8
0,25	402 ± 20	7,1	706 ± 4	7,8
0,50	437 ± 14	7,1	755 ± 5	7,8
1,00	510 ± 11	7,1	702 ± 8	7,6
2,50	515 ± 7	7,1	664 ± 17	7,6
5,00	478 ± 16	6,8	715 ± 3	7,4
10,00	428 ± 11	6,7	761 ± 8	7,4
15,00	470 ± 4	6,6	759 ± 6	7,4
20,00	537 ± 7	6,5	753 ± 6	7,5
25,00	503 ± 19	6,6	724 ± 12	7,6
35,00	452 ± 18	6,6	720 ± 12	7,4
40,00	162 ± 17	5,8	642 ± 18	7,2
45,00	118 ± 17	5,6	500 ± 5	6,8
50,00	46 ± 12	4,6	419 ± 11	5,8

Tabelle II. *Mucor pusillus.*

$MgSO_4$ %	Nach 7 Tagen		Nach 16 Tagen	
	Mycelgewicht	p_H	Mycelgewicht	p_H
0,00	50 ± 11	3,3	90 ± 7	2,6
0,01	145 ± 5	2,0	146 ± 19	2,0
0,025	168 ± 2	2,0	191 ± 2	1,8
0,05	147 ± 5	2,0	201 ± 9	1,6
0,10	152 ± 3	2,0	201 ± 10	1,6
0,25	144 ± 4	2,0	208 ± 5	1,6
0,50	174 ± 2	2,0	237 ± 8	1,6
1,00	169 ± 8	2,0	277 ± 2	1,6
2,50	166 ± 7	2,0	225 ± 10	1,6
5,00	132 ± 15	2,5	198 ± 33	1,8
10,00	89 ± 4	2,8	177 ± 12	2,0
15,00	79 ± 14	2,8	133 ± 25	2,0
20,00	39 ± 6	3,1	89 ± 11	2,3
25,00	14 ± 3	3,5	52 ± 5	2,7
35,00	9 ± 1	3,8	24 ± 6	2,9
40,00	10 ± 1	3,7	18 ± 9	3,2
45,00	5 ± 1	3,7	8 ± 1	3,2
50,00	2 ± 1	4,1	7 ± 1	3,2

sich an der Oberfläche der Lösung eine feste und stark gefaltete Decke; das Wachstum ist aber in den Parallelen nicht gleichmäßig, und es sind oft Inseln des stark entwickelten, mit dünnen Häutchen verbundenen Mycels zu beobachten. Bei den stärkeren $MgSO_4$-Gaben (von 5% aufwärts) ist die Farbe der Oberfläche stärker gelb. Sporenbildung erfolgt jedoch in allen Kölbchen, sogar auch in jenen mit 50% $MgSO_4$. Allein bei 0,0% $MgSO_4$ ist das Häutchen weißlich und schleimig. Wahrscheinlich ist auch hier das Magnesium in Spuren vorhanden, da die gebrauchten Chemikalien, besonders der käufliche Rohrzucker, nicht absolut rein sind. Bei der zweiten Ernte (nach 11 Tagen) war das Häutchen noch zäher und fester, an der Oberfläche mit braungrünen Sporen überdeckt; nur in den Lösungen mit 40 und 50% $MgSO_4$ ist das Häutchen zarter, schwach entwickelt und die Decke blaß grünlich. Im allgemeinen ist das Mycel besonders auf der Unterseite fest und mit weißlicher Kruste von Salzen überzogen. Andererseits war in Kölbchen ein Bodensatz festzustellen, hauptsächlich in $MgSO_4$-Konzentrationen von 0,5 bis 5,0%.

Die mikroskopische Kontrolle zeigte keinen besonderen Einfluß der höheren $MgSO_4$-Gaben auf die morphologischen Eigenschaften dieses Pilzes. Doch sind bei den höheren $MgSO_4$-Konzentrationen die Konidienträger und die Sterigmen kürzer, und als eine Anomalie haben wir, allerdings selten, fingerähnliche, manchmal auch verzweigte Sterigmen beobachtet. Sporenbildung erfolgt auch bei 50% $MgSO_4$. Auch die vegetativen Hyphen sind mehr oder weniger normal.

Mucor pusillus: Dieser Pilz zeigt eine schwächere Entwicklung, so daß ein sichtbares Wachstum erst im dritten Versuchstag zu beobachten ist. Die Sporenbildung ist nicht so üppig wie bei *A. flavus*, und eine bräunlich graue Überdecke macht sich hauptsächlich nur am Rande des Kölbchens bemerkbar. Bei höheren $MgSO_4$-Gaben bildet sich ein weißer Ring, während die Mitte nur von einem dünnen, zarten Häutchen überzogen ist. Aber auch bei diesem Pilz ist das Wachstum in den Parallelen unregelmäßig. Nach 16 Tagen (2. Ernte) war die Haut noch immer weich und schleimig, in Lösungen mit niedrigen $MgSO_4$-Gaben (bis 5%) mit vielen weißen warzigen Anhäufungen auf der Oberfläche.

Die mikroskopische Kontrolle zeigt, daß die Sporenbildung in größeren Mengen nur bei den Konzentrationen von 0,01 bis 0,5% $MgSO_4$ auftritt und von höheren Gaben gehemmt wird; bei 15 bis 20% $MgSO_4$ waren keine Sporen mehr festzustellen. Indessen beobachteten wir aufgeblasene, meist runde und oft an Hyphenenden liegende Zellen, ferner stark vakuolisierte vegetative Fäden mit kleinen oder großen Blasen. So sehen wir, daß auch die mikroskopische Durchprüfung für eine größere Empfindlichkeit dieses Pilzes gegenüber $MgSO_4$ spricht.

Die Ertragskurven für die beiden Pilze zeigen nun, daß *A. flavus* eine weit bessere Entwicklung und größere Resistenz gegenüber höheren Gaben des Magnesiumsulfates besitzt.

Bei *A. flavus* ist zunächst (1. Ernte, nach 4 Tagen) eine Steigerung der Ernten bis 1 bis 2,5% $MgSO_4$ festzustellen, danach ein Sinken, dem eine nochmalige Steigerung bei 20% $MgSO_4$ folgt. Bei der zweiten Ernte (nach 11 Tagen) wiederholt sich dieses zweite Maximum, liegt jedoch schon bei 10%. Von einer zeitlichen Maximumverschiebung und sonstigen Regelmäßigkeiten im Sinne des Ertragsgesetzes [*A. Rippel* (5)] kann in diesem Falle kaum die Rede sein. Die Angaben für die Reaktion zeigen, daß parallel mit stärkerem Wachstum auch eine stärkere Alkalisierung auftritt, wenigstens für die nicht allzu hohen $MgSO_4$-Gaben.

M. pusillus besitzt eine gleichmäßigere Kurve, nach 7 Tagen (1. Ernte) wurde eine Steigerung bis 0,025% $MgSO_4$, danach wieder eine bei 0,5% und weiter ein Sinken der Erträge festgestellt; bei hohen Gaben von 50% $MgSO_4$ ist der Ertrag gering. Nach 16 Tagen (2. Ernte) läuft die Kurve ähnlich mit etwas mehr ausgeprägtem Maximum bei 1% $MgSO_4$, während der absteigende Ast seinen Wendepunkt erst bei etwa 20% zeigt. Die Reaktion ist hier sehr sauer [$(NH_4)_2SO_4$]; es ist anzunehmen, daß sie die weitere Entwicklung hemmt. Deswegen sind auch die Erträge, besonders in der 2. Ernte, in einem großen Bereich ziemlich gleich. Aber schon die Tatsache, daß dem ursprünglichen

Aufsteigen der Kurve bei 0,025% $MgSO_4$ das Absteigen nicht sofort folgt, zeigt uns, daß neben der Nährstoffwirkung auch andere Faktoren mitwirken.

Versuch II.

Versuch I wurde wiederholt, mit dem Unterschied, daß jeder Pilz in den beiden Nährlösungen (*Aspergillus*- und *Mucor*-Lösung) gezogen wurde, um den Einfluß verschieden zusammengesetzter Nährlösungen auszuschalten. Die Stufen der $MgSO_4$-Gaben lagen weiter auseinander als im ersten Versuch.

Die Ernten sind in den Tabellen III und IV wiedergegeben.

Tabelle III. *Aspergillus flavus.*

$MgSO_4$	Nach 4 Tagen				Nach 22 Tagen			
	A-Lösung		M-Lösung		A-Lösung		M-Lösung	
%	Mycelgewicht	p_H	Mycelgewicht	p_H	Mycelgewicht	p_H	Mycelgewicht	p_H
0,00	31	6,5	24	2,5	109	6,6	115	1,5
0,05	166	6,9	267	1,5	606	8,5	370	1,4
0,10	438	7,2	269	1,5	609	8,8	347	1,4
1,00	341	6,6	250	1,5	678	8,0	414	1,4
2,50	273	6,5	237	1,5	722	7,8	472	1,4
5,00	274	6,5	255	1,5	688	8,3	496	1,5
10,00	242	6,5	237	1,5	729	8,4	509	1,4
20,00	264	6,5	270	1,4	964	8,6	711	1,4
25,00	386	7,2	258	1,5	994	8,6	622	1,5
35,00	339	7,0	199	1,5	—			

Tabelle IV. *Mucor pusillus.*

$MgSO_4$	Nach 4 Tagen				Nach 22 Tagen			
	A-Lösung		M-Lösung		A-Lösung		M-Lösung	
%	Mycelgewicht	p_H	Mycelgewicht	p_H	Mycelgewicht	p_H	Mycelgewicht	p_H
0,00	35	6,6	37	1,5	41	6,6	86	2,0
0,05	83	6,4	165	1,5	528	8,0	297	1,5
0,10	95	6,3	175	1,5	634	8,0	300	1,5
1,00	36	5,8	134	1,5	679	6,0	292	1,5
2,50	103	5,4	118	1,5	804	7,8	322	1,4
5,00	90	5,4	82	1,5	957	7,8	284	1,5
10,00	45	5,4	55	1,9	957	7,6	368	1,5
20,00	28	5,4	03	3,8	525	4,3	280	1,5
25,00	3	5,4	10	3,9	410	4,0	266	2,0

A. flavus: In der M (*Mucor*)-Lösung fängt das Wachstum etwas früher als in der A (*Aspergillus*)-Lösung an; das Häutchen ist zerbrechlich und halbschleimig, die Oberfläche blaß gelblichgrün, die Sporenbildung überall üppig. Die mikroskopische Durchprüfung des Mycels in der M-Lösung zeigte (2. Ernte) den Zerfall der meisten Hyphen in angeschwollene rundliche Zellen mit fester Zellwand und mit vielen

Reservestoffen. Solche Erscheinungen, obwohl im kleineren Ausmaße, wurden auch in Lösungen mit kleinen $MgSO_4$-Gaben (0,05 %) festgestellt und sind demnach mehr eine Folge der sauren Reaktion und des Kulturalters als des Einflusses der hohen Konzentrationen des Magnesiumsulfats.

M. pusillus: Das Wachstum in der A-Lösung ist in den ersten Tagen etwas verzögert; im Laufe der Zeit entwickelt sich aber eine schneeweiße, wasserreiche und schleimige Decke. Charakteristisch ist für das Wachstum dieses Pilzes in der A-Lösung das hoch ausgewachsene Mycel, während die Sporenbildung (bräunlich graue Farbe) sehr sparsam ist.

Wir sehen also, daß die Entwicklung schon makroskopisch, je nach Lösungen, verschieden ist.

Was die Zahlen in den Tabellen betrifft, so können wir feststellen, daß die Ertragskurve von *A. flavus* in der A-Lösung, trotz der geringeren Wachstumsintensität, doch ähnlich der im Versuch I ist. Bemerkenswert ist jedoch der Kurvenanstieg bei 20 bis 25 % $MgSO_4$ (2. Ernte, nach 22 Tagen); die mikroskopische Kontrolle zeigte, daß zwischen der Pilzhyphen eine sehr große Zahl von Kristallkonglomeraten eingelagert ist, welche mit gewöhnlichem Auswaschen des Mycels nicht zu beseitigen sind. Es ist also anzunehmen, daß diese Steigerung teilweise auf die Salzanhäufung in älteren Kulturen (nach 22 Tagen) zurückzuführen ist.

In der M-Lösung ist die Entwicklung gleichmäßiger; wie bei *Mucor* spielt auch hier die stark saure Reaktion eine große Rolle. Nach 22 Tagen wiederholt sich auch in diesem Falle ein ausgeprägter Anstieg der Kurve bei 20 % $MgSO_4$ (Salze, Inkrustierung! ?).

M. pusillus hat in der A-Lösung bei der 1. Ernte (4 Tage) eine charakteristische Biegung im Bereich von 1 bis 5 % $MgSO_4$. Während der zweiten Ernte (22 Tage) wurde eine sehr starke Steigerung der Erträge festgestellt mit dem Maximum bei 10 %. Dagegen hat die Ertragskurve in der M-Lösung einen ruhigeren Verlauf mit der gleichen Tendenz wie im Versuch I; nach 22 Tagen sind die Erträge größer, die Steigerung doch nicht so bedeutend wie in der A-Lösung (saure Reaktion, stärkere Sporenbildung).

In diesem Versuch wurde also festgestellt, daß *M. pusillus* in der A-Lösung besser wächst; außerdem daß die Intensität der Sporenwirkung bei steigendem Ertrag abnimmt.

Versuch III.

In diesem Versuch verwendeten wir die gleiche, d. h. A-Lösung für *A. flavus* und *M. pusillus*. Um eine gleichmäßigere Entwicklung der Pilzdecke an der Oberfläche der Nährlösung und damit auch eine gleichmäßigere

Entwicklung der Parallelkulturen zu erhalten, wurde 0,1% Agar zugefügt [*A. Rippel* (7)]. Ergänzend wurde auch der ökonomische Koeffizient (verbrauchte Saccharose) und der Aschegehalt bestimmt.

Die Ergebnisse zeigen die Tabellen V und VI.

Aspergillus flavus: Der Pilz entwickelt sich schon in den ersten Tagen stark, so daß nach 3 Tagen auch die Kölbchen mit 50% $MgSO_4$ mit einer gut gewachsenen Decke an der Oberfläche der Nährlösung überzogen sind. Das Häutchen ist sehr fest und zäh, mit vielen Sporen, die bei hohen $MgSO_4$-Gaben auch in diesem Falle eine heller gelbe Farbe besitzen.

In den Lösungen mit 0,5 bis 10% $MgSO_4$, besonders in älteren Kulturen, wurde ein reichlicher, schmutzigweißer und voluminöser Niederschlag festgestellt, in dem das Magnesium größtenteils als $Mg(OH)_2$ vorhanden ist. Außerdem ist auch die Unterseite des Häutchens bei diesen wie auch bei höheren $MgSO_4$-Gaben mit einer Salzkruste bedeckt.

Die mikroskopische Kontrolle in den Erntezeiten zeigte das gleiche Bild wie in den ersten beiden Versuchen. Blasen und ähnliche Erscheinungen konnten wir nicht feststellen.

Mucor pusillus: Während der 1. Ernte hat sich eine schneeweiße Decke in den Kölbchen bis 1% $MgSO_4$ entwickelt; in höheren $MgSO_4$-Konzentrationen ist die Entwicklung schwächer und größtenteils nur auf die Bildung eines Randringes beschränkt. Auch die Sporenbildung ist gering. Das Wachstum ist jedoch etwas gleichmäßiger als in den ersten Versuchen ohne Zusatz von Agar. Nach 19 Tagen (2. Ernte) hat sich ein dickes schleimig-wässeriges Häutchen entwickelt mit stärkerer Sporenbildung nur bei niederen $MgSO_4$-Gaben (von 0,01 bis 0,05%). Das Mycel wächst gut in der Nährlösung, so daß es diese fast vollständig ausfüllt.

Die Wirkung des Agars äußert sich bei den beiden Pilzen in einer intensiveren Entwicklung, und zwar bei *A. flavus* in der ersten Periode (nach 4 Tagen) in einem stärkeren Wachstum in niederen $MgSO_4$-Konzentrationen (0,05 bis 0,25%), in der zweiten Periode (nach 11 Tagen) in höheren Konzentrationen — von 1% weiter. Auch für *M. pusillus* ist in der Zeit der ersten Ernte eine üppigere Entwicklung bei den niedrigen $MgSO_4$-Gaben (bis 0,25%) festzustellen und ein allgemein besseres Wachstum bei der 2. Ernte.

Es ist bemerkenswert, daß der Agarzusatz kein gleichmäßigeres Wachstum der Versuchsparallelen verursacht hat (vgl. die wahrscheinlichen Schwankungen in Versuchen mit und ohne Agar).

Die Ertragskurve zeigt in diesem Versuch bei der ersten Ernte (nach 4 Tagen) in diesem Versuch zwei Maxima für *A. flavus:* das erste bei 0,05 bis 0,1% $MgSO_4$, das zweite bei 2,5 bzw. 20%. Nach 11 Tagen

Tabelle V. *Aspergillus flavus.*

$MgSO_4$ %	Nach 4 Tagen: Mycelgew. mg	Nach 4 Tagen: Verbrauchte Saccharose	Nach 4 Tagen: Ö. K.	Nach 4 Tagen: p_H	Nach 11 Tagen: Mycelgew. mg	Nach 11 Tagen: Verbrauchte Saccharose	Nach 11 Tagen: Ö. K.	Nach 11 Tagen: p_H	Nach 22 Tagen: Mycelgew. mg	Nach 22 Tagen: Verbrauchte Saccharose	Nach 22 Tagen: Ö. K.	Nach 22 Tagen: p_H	Nach 22 Tagen: Asche %	Nach 22 Tagen: Organische Substanz	Nach 22 Tagen: Korrig. ö. K.
0,01	313 ± 4	1126	27,7	7,2	380 ± 2	1617	23,5	8,0	453 ± 9	2162	21,9	8,0	7,5	419	19,4
0,05	600 ± 5	1745	34,0	7,4	633 ± 20			8,0	630 ± 15			8,8			
0,10	608 ± 20	1745	35,0	7,8	662 ± 2	2451	27,0	8,0	649 ± 10	2446	26,5	8,8	7,2	601	24,5
0,25	499 ± 16	1421	35,1	7,6	733 ± 17			8,0	707 ± 5			8,8			
0,50	419 ± 12	1660	39,6	7,6	751 ± 3	2424	31,0	7,6	714 ± 15	2451	29,1	8,8			
1,00	466 ± 5			7,4	802 ± 9	2429	33,0	7,5	786 ± 11			8,7			
2,50	512 ± 11	1205	42,6	7,6	804 ± 10	2347	33,2	7,8	815 ± 12	2452	33,2	9,0	16,3	680	27,7
5,00	494 ± 37			7,6	830 ± 6			7,8	829 ± 10			8,9			
10,00	452 ± 9	1265	36,0	7,4	839 ± 10			7,8	853 ± 17			8,8			
15,00	470 ± 53	1265	37,3	7,2	892 ± 8	2434	36,7	8,0	915 ± 25	2453	37,3	9,0	20,6	727	29,6
20,00	474 ± 25			7,2	901 ± 17	2440	35,4	8,0	947 ± 16	2458	38,0	8,9			
25,00	419 ± 17	1174	27,9	7,0	943 ± 16	2437	37,9	8,0	972 ± 10	2462	39,4	8,0	29,1	738	29,9
40,00	231 ± 10	874	26,6	6,4	905 ± 17	2550	35,5	7,5	1063 ± 17			8,0	30,3	741	
50,00	33 ± 4			6,0	662 ± 18			6,0	932 ± 5			7,4	54,0	428	

Tabelle VI. *Mucor pusillus.*

$MgSO_4$ %	Nach 7 Tagen: Mycelgew. mg	Nach 7 Tagen: Verbrauchte Saccharose	Nach 7 Tagen: Ö. K.	Nach 7 Tagen: p_H	Nach 19 Tagen: Mycelgew. mg	Nach 19 Tagen: Verbrauchte Saccharose	Nach 19 Tagen: Ö. K.	Nach 19 Tagen: p_H	$MgSO_4$ %	Nach 7 Tagen: Mycelgew. mg	Nach 7 Tagen: Verbrauchte Saccharose	Nach 7 Tagen: Ö. K.	Nach 7 Tagen: p_H	Nach 19 Tagen: Mycelgew. mg	Nach 19 Tagen: Verbrauchte Saccharose	Nach 19 Tagen: Ö. K.	Nach 19 Tagen: p_H
0,01	170 ± 8	837	20,3	6,3	491 ± 17	1589	25,9	4,7	5,00	106 ± 4			5,7	586 ± 20			4,4
0,05	270 ± 8	1261	21,4	6,8	543 ± 8	2432	22,3	7,6	10,00	55 ± 1			5,5	463 ± 11	2403	19,3	4,1
0,10	286 ± 4	1022	28,0	6,3	600 ± 9	2409	24,9	5,6	15,00	50 ± 2	500	10,0	5,4	483 ± 9			4,1
0,25	78 ± 11	332	23,5	6,3	475 ± 18	2132	22,3	4,7	20,00	21 ± 3	420	6,4	5,4	390 ± 10			4,0
0,50	95 ± 3			6,2	567 ± 17			5,0	25,00	15 ± 1			5,1	141 ± 12			4,0
1,00	76 ± 6	316	24,1	6,0	581 ± 4			4,6	40,00	6 ± 1			4,9	26 ± 1	267	9,8	3,7
2,50	115 ± 23	354	30,8	6,0	611 ± 19	2294	26,7	4,6	50,00				—	10 ± 1			3,6

läuft die Kurve jedoch gleichmäßiger und steigt allmählich bis 20—25 %; nach 22 Tagen (3. Ernte) fanden keine größeren Veränderungen statt. Hier ist sogar eine Abnahme der Ernten zu beobachten, die auf Autolyse zurückzuführen ist. Das bestätigt auch die Bestimmung des in der Nährlösung verbliebenen Zuckers.

Der ökonomische Koeffizient zeigt eine gute Parallelität mit den Erträgen. Während der ersten Ernte erreicht er den größten Wert im Bereich des 2. Maximums (42,6). Die Aschebestimmung führte zu dem unerwarteten Ergebnis, daß der Aschegehalt nach 22 Tagen außerordentlich groß ist (bis 54 % der Trockensubstanz bei 50 % $MgSO_4$); der tatsächliche Ertrag ist also hier bedeutend niedriger, bzw. die ausgeprägte Steigerung bei hohen $MgSO_4$-Gaben ist eigentlich durch die Einlagerung des Salzes im Pilzmycel verursacht; weitere Ascheanalysen zeigten, daß es sich natürlich um Mg-Salze handelt (MgO in der Asche). Dieser Befund ist weiter durch den histochemischen Nachweis des Magnesiums im Pilzmycel bestätigt. Es ist selbstverständlich, daß solche großen Aschenmengen nicht innerhalb, sondern größtenteils außerhalb der Zellen liegen; mikroskopisch sieht man die Ablagerungen zwischen den Hyphen.

Es wurde noch versucht, den Aschegehalt des Mycels dadurch herunterzudrücken, daß einige Proben mit verschieden stark angesäuertem Wasser ausgewaschen bzw. verschieden lange Zeit in verdünnter Salzsäure liegengelassen wurden. Erst das Liegen des Pilzmycels 1 Stunde lang in 1 : 50 verd. Salzsäure genügt praktisch, um alle Salze zu beseitigen.

Die Steigerung der Kurve bei der 2. Ernte können wir ebenfalls auf Grund des Aussehens des Mycels und der mikroskopischen Prüfung auf den großen Aschegehalt zurückführen, obwohl eine Aschebestimmung hier nicht durchgeführt wurde.

Die Reaktion ist alkalisch, so daß der p_H-Wert in alten Kulturen bis 9,0 steigt; das Magnesium fällt als $Mg(OH)_2$, besonders im Bereich von 0,5 bis 5 % $MgSO_4$ aus. Das bedeutet aber, daß der tatsächliche Gehalt an $MgSO_4$ in diesen Kölbchen (in der Lösung) viel niedriger ist; es ist nicht ausgeschlossen, daß das Ansteigen der Erträge in diesem Bereich (besonders 1. Ernte) damit in Zusammenhang steht.

Im Versuch mit *M. pusillus* wurde — ähnlich wie im Versuch II mit der A-Lösung — ein Maximum bei 0,1 % $MgSO_4$ festgestellt, dann ein zweites, viel niedrigeres bei 2,5 %. Bei der 2. Ernte (nach 19 Tagen) wiederholt sich dies, obwohl die Biegung der Kurve nicht so stark ist.

Der Aschegehalt ist in diesem Versuch leider nicht quantitativ bestimmt. Nach der mikroskopischen Kontrolle und dem Aussehen des getrockneten Mycels (das sehr hart ist), kann es aber nicht zweifelhaft sein, daß die Asche auch hier in der Trockensubstanz stark vertreten ist und ihr die großen Erträge bei hohen $MgSO_4$-Gaben zuzuschreiben sind.

Der ökonomische Koeffizient ist hier zwar niedriger, stimmt aber gut mit den Erträgen überein; sehr kleine ökonomische Koeffizienten bei den hohen $MgSO_4$-Konzentrationen sprechen außerdem für eine unökonomische Arbeit dieses Pilzes und indirekt für eine hemmende Wirkung dieser hohen $MgSO_4$-Gaben.

Die Reaktion verändert sich hier weniger und ist sogar bei den höheren $MgSO_4$-Gaben sauer (Einfluß des $MgSO_4$ oder der gebildeten organischen Säuren!?).

Versuch IV.

Der Versuch mit *A. flavus* wurde mit der A-Nährlösung, aber bei verschiedener Reaktion durchgeführt: bei p_H 6,5 (wie in den früheren Versuchen) und bei p_H 4,0, d. h. bei saurer Reaktion, um damit die Fällung von Magnesium während des Wachstums des Pilzes zu vermeiden. Die Lösungen mit p_H 4,0 waren bei deren Herstellung wie auch später während des Versuchs ganz klar.

Für *M. pusillus* wurde auch in diesem Versuch nur die Nährlösung mit p_H 6,5 verwendet, da hier weder Alkalisierung noch Fällung des Niederschlages entsteht.

Beim Ernten wurden die Salze praktisch vollständig entfernt (Liegen des Mycels 1 Stunde in 1 : 50 verdünnter HCl). Der Aschegehalt und die verbrauchte Saccharose wurden auch in diesem Versuch bestimmt.

Die Ergebnisse sind in den Tabellen VII und VIII sowie in Abb. 1 dargestellt.



Abb. 1. Aspergillus flavus: ——— 1. Ernte, ——— 2. Ernte.
Mucor pusillus: – – – 1. Ernte, – – – 2. Ernte.

A. flavus: In der sauren Nährlösung ist die Entwicklung in den ersten Tagen etwas besser, sonst ist das Aussehen des Häutchens das gleiche wie in neutraler Lösung.

Die mikroskopische Kontrolle der einzelnen Pilze zeigte auch hier die Kristallglomerate an der Unterseite der Pilzdecke, und zwar besonders im Bereich von 5 bis 25% $MgSO_4$; in höheren Konzentrationen ist das Häutchen schwächer entwickelt, weicher, und bei 70% $MgSO_4$ ist die Entwicklung vollständig gehemmt (keine Sporenbildung). In diesem

Tabelle VII. *Aspergillus flavus.*

$MgSO_4$	Nach 4 Tagen										Nach 12 Tagen									
	Mycelgewicht mg		Verbrauchte Saccharose		Ökonom. Koeffizient		Reaktion		Asche %		Mycelgewicht mg		Verbrauchte Saccharose		Ökonom. Koeffizient		Reaktion		Asche %	
%	p_H 4,0	p_H 6,5	p_H 4,0	p_H 6,5	4,0	6,5	4,0	6,5	4,0	6,5	p_H 4,0	p_H 6,5	p_H 4,0	p_H 6,5	4,0	6,5	4,0	6,5	4,0	6,5
0,01	276 ± 10	263 ± 7	1033	1075	26,7	24,5	6,5	6,8			384 ± 11	393 ± 2	1763	2077	21,8	21,4	6,4	7,3	2,4	2,2
0,05	422 ± 5	407 ± 23	1425	1584	29,6	25,7	6,7	7,6	2,9	3,1	577 ± 17	502 ± 26	2226	2225	25,7	22,6	8,0	8,5		
0,10	456 ± 12	421 ± 22	1381		33,0		6,7	7,8			597 ± 7	645 ± 8		2230			8,0	8,5		
0,25	524 ± 17	492 ± 16					6,8	7,9	3,1		559 ± 20	666 ± 3	2230		25,1		8,0	8,6		
0,50	453 ± 3	552 ± 30	1424	1743	31,8	31,5	6,2	7,9		3,1	610 ± 20	669 ± 5		2228		30,0	7,8	8,5		3,3
1,00	480 ± 9	559 ± 15					6,2	7,0			642 ± 9	654 ± 6					7,8	8,5		
2,50	536 ± 15	534 ± 26	1541	1720	28,2	30,6	6,0	6,5			642 ± 8	635 ± 4	2229	2227	28,8	28,5	7,4	8,4		
5,00	595 ± 69	467 ± 3	1841		32,3		6,2	6,4			674 ± 27	618 ± 13	2226		30,1		7,8	8,5	3,6	4,6
10,00	616 ± 32	437 ± 20					6,8	6,6	3,3	2,9	264 ± 17	698 ± 15					8,0	8,5		4,0
15,00	606 ± 29	292 ± 10		884		33,0	7,1	6,5			682 ± 24	730 ± 6		2230		32,7	8,0	8,3	3,7	
20,00	641 ± 17	265 ± 18	2000		32,1		7,2	6,4			682 ± 5	669 ± 13	2280		30,6		8,0	8,3	3,9	
25,00	575 ± 21	246 ± 21					6,9	6,4			665 ± 2	642 ± 9					8,0	8,3		
30,00	552 ± 6	158 ± 10	2070	593	28,0	26,7	7,2	6,4	3,5	3,4	612 ± 7	606 ± 18	2232	2229	27,4	27,1	8,0	8,0	6,8	
50,00	89 ± 3	35 ± 2					—	6,6			322 ± 7	316 ± 20		2217			8,0	6,9	6,8	7,0
70,00	—	—					6,8	5,9			—	—								

Tabelle VIII. *Mucor pusillus.*

$MgSO_4$ in %	Nach 7 Tagen					Nach 16 Tagen				
	Mycelgewicht mg	Verbrauchte Saccharose	Ö. K.	p_H	Asche %	Mycelgewicht mg	Verbrauchte Saccharose	Ö. K.	p_H	Asche
0,01	133 ± 2	860	17,5	6,0		286 ± 7	1581	18,0	5,7	
0,05	226 ± 29	1215	18,6	5,9	5,2	592 ± 12	2232	26,5	7,2	11,6
0,10	38 ± 6	290	13,1	6,1		288 ± 7	1325	21,7	5,3	
0,25	30 ± 4			6,1		309 ± 19	1165	25,8	5,2	11,1
0,50	24 ± 6			6,1		315 ± 80	1085	29,1	6,0	
1,00	25 ± 9	265	9,5	6,0		342 ± 11			5,0	
2,50	24 ± 1			5,6	4,4	—			5,0	14,7
5,00	26 ± 1	315	8,3	5,4		164 ± 9			—	

$MgSO_4$ in %	Nach 7 Tagen					Nach 16 Tagen				
	Mycelgewicht mg	Verbrauchte Saccharose	Ö. K.	p_H	Asche	Mycelgewicht mg	Verbrauchte Saccharose	Ö. K.	p_H	Asche
10,00	12 ± 1			6,0		63 ± 4			4,5	
15,00	11 ± 2			6,0		70 ± 4			4,4	
20,00	10 ± 1			6,1		29 ± 5			4,5	
25,00	10 ± 1			6,0	2,7	20 ± 2				
30,00	8 ± 1	160	5,0	6,0		16 ± 2				
50,00	—			5,7		12 ± 1	410	2,9	5,5	5,3
70,00	—			5,7		—				

Versuch war die Sporenbildung nicht so üppig, und man konnte oft weiße Flecken des Vegetativmycels zwischen den grünen Inseln der Konidien beobachten.

M. pusillus: In den ersten Tagen war die Entwicklung außerordentlich schwach und auf die Bildung eines weißen Ringes beschränkt. Die Sporenbildung war nicht nur gering, sondern auch sehr unregelmäßig; z. B. bildete der Pilz bei 0,5 % $MgSO_4$ in zwei Fällen sehr viele Sporen, in den anderen zwei Parallelen ein mächtiges Mycel ohne Sporen.

Ein Niederschlag in den Kölbchen wurde nur für *A. flavus* bei p_H 6,5 festgestellt und zwar im Bereich von 0,5 bis 15 % $MgSO_4$.

Die Ertragskurve von *A. flavus* bei p_H 6,5 unterscheidet sich von den Ertragskurven in früheren Versuchen dadurch, daß sie keine Ertragssteigerungen im Bereich von 10 bis 30 % $MgSO_4$ zeigt (Beseitigung der Salze!?). Im Versuch bei p_H 4,0 ist der Kurvenverlauf anders; das zweite Maximum ist im großen Bereich von 5 bis 20 % $MgSO_4$ (1. Ernte) vorhanden.

Der Aschegehalt ist niedrig, d. h. normal (bis 7 % nach 12 Tagen). Der ökonomische Koeffizient ist praktisch der gleiche in beiden Versuchsreihen. Die Reaktion zeigt auch im Versuch bei p_H 4,0 eine Alkalisierung, die indessen gering ist; ein Niederschlag bildet sich nicht.

Wir sehen also, daß die Reaktion die Erträge von *A. flavus* in verschiedenen $MgSO_4$-Lösungen beeinflußt. Gerade im Bereich der $MgSO_4$-Gaben, in welchem bei den ersten Versuchen ein Bodensatz festgestellt wurde, ist der Kurvenverlauf bei p_H 4,0 anders, und zwar läßt sich hier ein ausgeprägtes Maximum erkennen.

Für *M. pusillus* wurden im Verhältnis zu den ersten Versuchen niedrigere Erträge erhalten. Ein deutliches Maximum wurde für die beiden Ernten bei 0,05 % $MgSO_4$ gefunden. Der ökonomische Koeffizient war auch hier niedrig, der Aschegehalt verhältnismäßig hoch (bis 15 % bei 2,50 % $MgSO_4$).

Auch in diesem Versuch mit *M. pusillus* konnten wir nur bei niederen $MgSO_4$-Gaben eine gute Entwicklung feststellen; andererseits treten solche Streuungen und Unregelmäßigkeiten bei hohen $MgSO_4$-Konzentrationen, wie sie für *A. flavus* typisch sind, hier nicht auf.

Besprechung der Ergebnisse.

Es sei zunächst hervorgehoben, daß die von *W. Lohrmann* (2) festgestellte Wirkung von $MgSO_4$ auf *Aspergillus flavus* und *Mucor pusillus* wie auch die scheinbar größere Resistenz von *A. flavus* gegenüber $MgSO_4$ durch diese Versuche bestätigt werden konnten (vgl. hierzu Abb. 1). Aus allen Versuchen geht hervor, daß bei *A. flavus* eine Schädigung erst bei sehr hohen $MgSO_4$-Gaben eintritt, während das Wachstum

von *M. pusillus* schon bei viel niedrigeren Konzentrationen gehemmt wird. Es ist jedoch bemerkenswert, daß auch *M. pusillus* sehr hohe $MgSO_4$-Konzentrationen vertragen kann, wenn auch hier die Entwicklung gering ist. Die absolute Resistenz ist für die beiden Pilze ungefähr die gleiche; die relative Wirkung der hohen $MgSO_4$-Gaben ist aber für die beiden Pilze verschieden, was ohne weiteres aus dem Kurvenverlauf der Erträge zu ersehen ist. Nur in diesem Sinne können wir von einer verschiedenen Empfindlichkeit der untersuchten Pilze gegenüber steigenden Gaben des $MgSO_4$ sprechen.

Es ist weiter hervorzuheben, daß ein und derselbe Pilz in mehreren, unter möglichst gleichen Bedingungen durchgeführten Versuchen, sehr verschiedene Erträge erreicht. Obwohl die Zahl der Parallelen in unseren Versuchen offenbar klein ist, können wir doch die auftretenden Verschiedenheiten in erster Linie als die große Reaktionsfähigkeit der Pilze gegenüber der Konstellation der Wachstumsfaktoren betrachten. Das oft unregelmäßige Wachstum des Pilzmycels auf der Oberfläche der Nährlösung zeigt z. B., daß trotz der ursprünglichen Homogenität der Lösung während des Wachstums des Pilzes bald Veränderungen eintreten (örtliche Versäuerung usw.).

Die Verschiedenheit unserer Ertragskurven für ein und den gleichen Pilz können wir aber, wenigstens zum Teil, auf bestimmte Faktoren zurückführen, so z. B. auf den Einfluß des Agars (in Versuch III) oder der Reaktion (im Versuch IV). Bei *M. pusillus* kommt dazu noch das Verhältnis zwischen dem vegetativen Wachstum und der Sporenbildung, eine Tatsache, die wir leider nicht quantitativ erfassen können.

Für die Bewertung der Pilzerträge bei verschiedenen $MgSO_4$-Gaben ist es wichtig, daß die schon erwähnten Unregelmäßigkeiten in größerem Ausmaße besonders bei den höheren, noch immer fördernden Konzentrationen des Magnesiumsulfats eintreten, so daß dort kein scharfes Maximum hervortritt, während bei den niedrigen, optimalen Gaben fast regelmäßig ein Maximum in relativ engerem Bereich der $MgSO_4$-Konzentrationen eintritt. Das bezieht sich zunächst auf die 1. Ernte, da sich später die Erträge ziemlich ausgleichen.

Wie schon bei der Besprechung des Versuchs III (*A. flavus*) erwähnt wurde, können wir den Anstieg der Erträge bei den höheren $MgSO_4$-Konzentrationen teilweise auch auf die Salzinkrustierung zurückführen, besonders bei den älteren Kulturen. Aus den Zahlen geht aber hervor, daß der Kurvenanstieg doch nicht völlig durch den Aschegehalt gedeckt wird. Außerdem konnten wir auch im Versuch IV, wo die Salze aus den Mycelernten praktisch vollständig beseitigt wurden, ebenfalls einen Anstieg bei hohen $MgSO_4$-Gaben feststellen. Wir können also von einer Förderung durch die hohen Konzentrationen von $MgSO_4$ sprechen. Im Sinne der Erklärungen, die *A. Rippel* (5, 9) für das

Ertragsgesetz, sowie für den Begriff der Nährstoffwirkung gibt, können wir sagen, daß in diesen Fällen in niederen (optimalen) $MgSO_4$-Konzentrationen das Magnesium als Elementarnährstoff wirkt, während bei den höheren (überoptimalen) Gaben des Magnesiumsulfats die Wirkung des Neutralsalzes $MgSO_4$ mit allen seinen Nebenwirkungen in Frage kommt. Wenn wir indessen das $MgSO_4$ als „Nahrung" betrachten, dann sehen wir, daß seine fördernde Wirkung bei *A. flavus* einen sehr breiten Bereich umfaßt, etwa bis 40 % $MgSO_4$, und daß sich bei *M. pusillus*, der empfindlicher ist, die Salzwirkung weniger äußert. Für uns hat besonders dieser zweite Teil des aufsteigenden Astes Interesse, da sich in diesem Bereich die komplexe Wirkung des Salzes abspielt.

Dabei gibt *A. flavus* wegen seiner Plastizität gegenüber $MgSO_4$ ein aufschlußreicheres Material als *M. pusillus*. Allgemein genommen wurde hier ein Optimum für Magnesium im Bereich unter 1 % $MgSO_4$ festgestellt (etwa bei 0,05 bis 0,1 %; im Versuch IV mit p_H 4,0 bei 0,25 % $MgSO_4$). Schon bei den Konzentrationen über 1 % $MgSO_4$ spielen offenbar noch andere Faktoren eine Rolle, Faktoren, die fördernd wirken und in welchen die Wirkung des Magnesiums als Elementarnährstoff schon überdeckt ist. Hier können wir voraussetzen, daß das $MgSO_4$ als Salz (undissoziierte Moleküle) und auch als Mg-Kation bzw. als SO_4-Anion wirkt. Ob diese Wirkung rein chemischer Natur ist (Reaktionen in den Lösungen) oder ob es sich mehr um physiologisch-chemische Vorgänge handelt (Wirkung auf das Plasma), ist schwer zu entscheiden.

Chemische Veränderungen in der Nährlösung sind möglich, es sprechen dafür viele Erscheinungen. Schon der einfache Zusatz von größeren $MgSO_4$-Gaben, von 5 % aufwärts, ändert merklich die Reaktion der Lösung und das ursprüngliche p_H sinkt (bei 50 % $MgSO_4$ von 6,5 auf etwa 5,0). Andererseits haben wir bei der alkalischen Reaktion, die während des Wachstums eintritt, eine Fällung der Salze festgestellt, und zwar besonders im Bereich von 0,5 bis 10 % $MgSO_4$, also im Bereich, der durch den Wendepunkt charakterisiert ist. Endlich zeigt auch der Versuch IV mit der sauren Lösung, daß gerade in diesem letzten Teil des aufsteigenden Astes Veränderungen eintreten; hier war (1. Ernte) der Ertrag größer, wahrscheinlich wegen der stärkeren Löslichkeit der aktiven Stoffe.

Die Erklärung dieser Erscheinungen nur auf dem chemischen Wege ist aber einseitig und kann uns nicht befriedigen. In Versuchen von *W. Lohrmann* wurde eine antagonistische Wirkung hoher $MgSO_4$-Gaben festgestellt, so daß diese Gaben die von Sublimat oder Borsäure verursachten Schädigungen beheben können; es handelt sich also um einen physiologisch-chemischen Antagonismus, der mit den Lebensvorgängen des Organismus verknüpft ist. Denn die Mengen von Sublimat bzw. von

Borsäure waren verhältnismäßig so gering, daß rein chemische Wirkungen mit den hohen $MgSO_4$-Gaben ausgeschlossen sind. Die Erscheinung des Antagonismus spricht auch für eine Salzwirkung, da sie sich bei solchen Konzentrationen äußert, die weit über die Grenze des Normalbedarfs des Pilzes an dem Nährstoff Magnesium liegen. Dies ist nur eine Komponente der mannigfaltigen komplexen Wirkung des $MgSO_4$; in unseren Versuchen können wir auch auf eine antagonistische Wirkung des Magnesiumsulfats gegenüber den anderen Bestandteilen der Nährlösung vermuten.

Bei den hohen Salzkonzentrationen müssen wir weiter auch dem hohen osmotischen Druck eine gewisse Wirkung zuschreiben. Verschiedene Literaturangaben zeigen, daß besonders die kosmopolitisch verbreiteten *Aspergillus*-Arten, weniger die *Mucor*-Arten, sehr hohe Salzkonzentrationen vertragen können. So fand *D. Rabinovitz-Sereni* (4), daß manche Pilze und Bakterien bis 40% $MgSO_4$ vertragen können, und daß der toxische Effekt der höheren Konzentrationen auf den hohen osmotischen Druck zurückzuführen ist; *G. Schoop* (10) erwähnt *A. flavus* als einen fakultativ halophilen Organismus. Es sei doch hier bemerkt, daß die osmotischen Werte des $MgSO_4$ im Vergleich mit $NaCl$ in äquimolaren Lösungen viel niedriger sind [*H. Walter* (12)]. In unseren Nährlösungen mit 40% $MgSO_4$ beträgt der osmotische Wert etwa 90 atm., bei 50% 110 atm. und bei 70% schon etwa 150 atm. Das sind schon sehr hohe Werte, die zeigen, daß die Pilze ein sehr hohes osmotisches Niveau ertragen können. Dies gilt für *A. flavus* besonders, während *M. pusillus* empfindlicher ist. So können wir für den ersten Pilz sagen, daß der Einfluß des osmotischen Druckes von sekundärem Charakter ist (wenigstens bis 40% $MgSO_4$) und daß bei diesem osmotoleranten Pilz die fördernde Wirkung von größeren $MgSO_4$-Konzentrationen auf die spezifische Wirkung des Salzes zurückzuführen ist. Bei *M. pusillus* ist jedoch wahrscheinlicher, daß diese spezifische Wirkung durch den Einfluß der hohen osmotischen Werte überdeckt wird. Die mikroskopische Überprüfung gab, daß bei den hohen $MgSO_4$-Gaben die Hyphen von *M. pusillus* verhältnismäßig dünn und vakuolisiert sind.

Bei den obligat halophilen Organismen sind die Verhältnisse relativ einfach, da $NaCl$ keine ausgesprochene Nährstoffwirkung besitzt; in Versuchen mit $MgSO_4$ kommt aber die Nährstoff- wie auch die Salzwirkung stärker zum Ausdruck, und die Kurven sind mehr oder weniger zweigipfelig. Wahrscheinlich besteht hier der Unterschied zwischen $NaCl$ und $MgSO_4$, deren Ionen auch in lyotroper Reihe weit voneinander liegen. Während die Halophilie mehr mit der osmotischen Resistenz verbunden ist — die obligaten Halophyten wachsen bei niederen $NaCl$-Konzentrationen überhaupt nicht — ist die festgestellte Resistenz gegenüber $MgSO_4$ mehr eine Folge der kombinierten spezifischen

Nährstoff- und Salzwirkung. Hier spielt auch die Tatsache eine Rolle, daß die Mg- wie auch die SO_4-Ionen langsamer in die Zelle permeieren als NaCl, und daß das $MgSO_4$ einen verhältnismäßig geringeren osmotischen Wert besitzt.

Die Literaturangaben über die physiologische Wirkung von $MgSO_4$ (Ionenantagonismus, Permeabilität, lyotrope Effekte, spezifische Wirkung usw.) können wir nicht ohne weiteres auf unsere Betrachtungen anwenden, da sie sich hauptsächlich auf niedere Salzkonzentrationen beziehen. Hinsichtlich des Einflusses von Ionen im Sinne lyotroper Reihen, die bei den höheren Konzentrationen der Salze zum Ausdruck kommen, wissen wir, daß die Mg- und SO_4-Ionen verhältnismäßig schwer aufgenommen werden bzw. daß sie die Permeabilität durch entquellende Wirkung auf das Plasma vermindern. Die Verhältnisse sind jedoch nicht so einfach, da z. B. in mehreren Fällen festgestellt wurde, daß das Mg-Ion auch als einwertiges Ion wirken kann, und daß nach der Salzkonzentration und aus anderen Gründen eine Verschiebung oder sogar eine Umkehrung der lyotropen Ionenreihen möglich ist. Es ist nicht ausgeschlossen, daß das Mg-Ion in höheren Konzentrationen fördernd auf die Permeabilität wirkt, was zum Teil auch unsere Ergebnisse erklären könnte.

Andererseits ist sicher, daß das SO_4-Anion eine Rolle in den hohen $MgSO_4$-Konzentrationen spielt. Die Untersuchungen von *A. Rippel* und *K. Behr* (8) wie die von *K. Mothes* (3) deuten darauf hin, daß das SO_4-Ion in den Nährlösungen (für *A. niger*) großen Veränderungen unterworfen ist, obwohl es an sich die physiologisch stabile, wenig aktive Form des Schwefels darstellt. Die Wirkung von $MgSO_4$-Molekülen können wir auch voraussetzen, was aber in diesen Untersuchungen ein ebenso wenig kontrollierbarer Faktor ist wie die wahrscheinlichen antagonistischen Erscheinungen bei hohen Gaben von $MgSO_4$. Endlich kompliziert sich diese Faktorenkonstellation noch dadurch, daß zwischen Salzaufnahmen und Gesamtstoffwechsel eine enge Beziehung besteht. Wir können nur voraussetzen, daß sich bei hohen, noch immer fördernden $MgSO_4$-Konzentrationen in erster Linie die spezifische Wirkung des Salzes $MgSO_4$ äußert, und daß die anderen Faktoren (Ionenwirkung, Antagonismen, Nährstoffwirkung) durch diese großen $MgSO_4$-Gaben physiologisch verdrängt sind.

Während für den „Nährstoff" im engeren Sinne des Wortes ein primäres, unmittelbares Eingreifen in die Vorgänge, die zur Ertragsbildung führen, charakteristisch ist [*A. Rippel* (9)], haben wir es also bei der „Salzwirkung" auch mit einer indirekten Wirkung zu tun. Das ist in jenem Bereich der Ertragskurve, wo die fördernde Wirkung des Magnesiumsulfats von der Hemmungswirkung allmählich überdeckt wird, und wo allmählich schon Konzentrationswirkungen eintreten.

Für *A. flavus* ist dieser Bereich breit; deswegen finden sich auch solche Verschiedenheiten in einzelnen Versuchen. Übrigens zeigt die mikroskopische Kontrolle, daß die hohen $MgSO_4$-Gaben nur wenig auf die morphologischen Eigenschaften des Mycels einwirken; die festgestellten Anomalien sind mehr dem Alter der Kulturen bzw. der Reaktion der Nährlösung zuzuschreiben. Erst bei 70% $MgSO_4$ (gesättigte Lösung) ist die Hemmung vollständig und die geimpften Sporen keimen nicht mehr. Auch hier tritt der osmophile Charakter dieses Pilzes hervor.

Die Bestimmung der Reaktion, der verbrauchten Saccharose sowie des Aschegehalts erklären nur zum Teil diese Verhältnisse. Hinsichtlich der Reaktion wurde für *A. flavus* eine allmähliche Alkalisierung festgestellt, die bei den hohen $MgSO_4$-Gaben gering ist; auch organische Säuren bilden sich wahrscheinlich nicht in großem Ausmaße, worauf wir u. a. aus dem verhältnismäßig hohen ökonomischen Koeffizienten schließen können; er stimmt gut mit den Erträgen überein, d. h. steigt mit zunehmendem Ertrag. Es ist hier bemerkenswert, daß der ökonomische Koeffizient auch bei hohen $MgSO_4$-Gaben hoch ist, was wiederum die große Resistenz dieses Pilzes andeutet. *D. Buromsky* (1) konnte für *A. niger* ebenfalls einen größeren ökonomischen Koeffizienten bei etwas steigenden Konzentrationen von $MgSO_4$ (von 0,0 bis 0,5%) feststellen und schließt daraus auf die „stimulative" Wirkung dieses Salzes. Andererseits sinkt der ökonomische Koeffizient mit dem Alter der Kultur, besonders in niederen Konzentrationen. Das gleiche fand, wenn auch unter Anwendung einer anderen Methode, auch *V. O. Tausson* (11) für *A. flavus*.

Eine Analyse der Ertragskurven für *A. flavus* nach dem Ertragsgesetz zeigt ein ziemlich unklares Bild. Die zeitliche Maximumverschiebung konnten wir in unseren Versuchen nicht immer feststellen (im Versuch IV bei p_H 4,0 sogar das umgekehrte). Hier sei erwähnt, daß auch bei den höheren Pflanzen [*A. Rippel* und *R. Meyer* (6)] durch überoptimale Konzentrationen des Hauptfaktors Unregelmäßigkeiten eintreten (Rückläufigkeit des Maximums usw.), und daß die Wirkung der Nebenfaktoren um so mehr hervortritt, je mehr sich der Hauptfaktor aus dem Bereich der Anstiegtangente entfernt.

M. pusillus zeigt größere Empfindlichkeit gegenüber $MgSO_4$. Die optimale Gabe beträgt 0,05 bis 0,1%; höhere Gaben schädigen. Im Versuch I wurde dieser Fall zwar nicht gefunden, und die Kurve läuft ungefähr horizontal, aber wegen der bald eintretenden Versäuerung bildet sich in niedrigen, optimalen $MgSO_4$-Konzentrationen kein ausgeprägtes Maximum. Dieses Maximum kommt als Folge der Nährstoffwirkung des Magnesiums zustande. Obwohl schon theoretisch — wegen

der Empfindlichkeit — eine stärkere „Salzwirkung" nicht erwartet werden kann, können wir doch diese Wirkung bei 1 % bzw. 2,5 % $MgSO_4$ vermuten (Erträge im Versuch III bzw. IV).

Wir haben schon erwähnt, daß die Intensität der Sporenbildung die Erträge beeinflußt; ob die kleine Steigerung der Kurve im Bereich über 1 % $MgSO_4$ mit dieser Erscheinung (üppige Bildung des vegetativen Mycels) zu erklären ist, oder sich besser durch irgendeine andere physiologisch-chemische Wirkung erklären läßt, ist schwer zu sagen (im Versuch IV ist bei 0,5 % $MgSO_4$ der Ertrag des Mycels in den Kölbchen mit stärkerer Sporenbildung 14 bzw. 16 mg, in einer anderen Parallele ohne Sporen 315 mg). Es ist natürlich nicht ausgeschlossen, daß auch in diesem Falle komplexe Vorgänge auftreten.

Diese, wenn auch nicht so ausgeprägte Salzwirkung, äußert sich bei *M. pusillus* in der Weise, daß nach dem Überschreiten der optimalen Gaben das Absinken des Ertrages sich bald verzögert und sogar in eine geringe Steigerung umkehrt. Wegen der größeren Empfindlichkeit dieses Pilzes gegenüber der hohen $MgSO_4$-Gaben können wir hier aber ein so ausgedehntes zweites Maximum und so große Streuungen wie bei *A. flavus* nicht erwarten.

Die über das Ertragsgesetz und *A. flavus* gemachten Angaben gelten auch für *M. pusillus*. Eine zeitliche Maximumverschiebung wurde bei diesem Pilz nicht festgestellt. Der ökonomische Koeffizient steigt in älteren Kulturen. Der Unterschied gegenüber *A. flavus* ist jedoch nur scheinbar, da *M. pusillus* viel langsamer wächst. Es folgt daraus, daß z. B. im Versuch IV für die Bewertung der Salzwirkung nicht die Erträge der 1., sondern die der 2. Ernte (nach 16 Tagen) maßgebender sind; hier ist das Wachstum intensiver, die Zuckerausnutzung größer und auch das zweite Maximum ist hier besser ausgeprägt.

Zusammenfassung.

Die untersuchten Pilze, *Aspergillus flavus* und *Mucor pusillus*, sind gegenüber hohen $MgSO_4$-Gaben resistent, so daß sie noch bei 50 % $MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$ wachsen. Doch ist die Entwicklung der Pilze bei steigenden $MgSO_4$-Konzentrationen in der Nährlösung insofern verschieden, als die Entwicklung von *M. pusillus* schon bei niederen Konzentrationen (über 2,5 %) verzögert wird, während bei *A. flavus* erst in den Lösungen mit über 40 % $MgSO_4$ eine merkliche Schädigung eintritt.

Neben einem Maximum der Erträge bei niederen, optimalen Gaben von $MgSO_4$ (etwa 0,05 bis 1 %), das der Wirkung von Magnesium als Elementarnährstoff zuzuschreiben ist, wurde eine zweite Steigerung

bei höheren Salzkonzentrationen festgestellt. Dieses Maximum umfaßt einen breiteren Konzentrationsbereich als das erste und ist bei *A. flavus* stärker als bei *M. pusillus* ausgeprägt.

Die fördernde Wirkung der höheren $MgSO_4$-Konzentrationen läßt sich durch rein chemische Vorgänge, wie auch durch osmotische Verhältnisse in der Nährlösung nicht erklären; sie steht mit der spezifischen physiologischen Wirkung des Salzes $MgSO_4$ in engem Zusammenhang.

Zum Schluß möchte ich Herrn Prof. *A. Rippel* für die Anregung wie auch für die Unterstützung und Ratschläge während der Durchführung der vorliegenden Arbeit meinen besten Dank aussprechen.

Literatur.

1) *Buromsky, D.*, Mikrobiologija (russ.) **5**, 800, 1936. — 2) *Lohrmann, W.*, diese Zeitschr. **11**, 329, 1940. — 3) *Mothes, K.*, Planta **29**, 67, 1938. — 4) *Rabinovitz-Sereni, D.*, Boll. Reg. Staz. Pat. Veg. **13**, 103, 1933. — 5) *Rippel, A.*, Das Ertragsgesetz. In Honcamp's Handb. d. Pflanzenernährung. Bd. I, S. 602. Berlin, Springer, 1931. — 6) *Derselbe* u. *R. Meyer*, Zeitschr. f. Pflanzenernährung usw. (A) **27**, 257, 1933. — 7) *Rippel, A.*, diese Zeitschr. **7**, 210, 1936. — 8) *Rippel, A.*, u. *G. Behr*, ebenda **7**, 584, 1936. — 9) *Rippel, A.*, u. *W. Lohrmann*, Nachr. aus d. Biologie (Ges. d. Wiss. Göttingen) **3**, 239, 1940. — 10) *Schoop, G.*, Deutsch. Tierärztl. Wochenschr. **42**, 816, 1934. — 11) *Tausson, V. O.*, Mikrobiologija (russ.) **6**, 542, 1937. — 12) *Walter, H.*, Bericht. d. Deutsch. Bot. Ges. LIV, S. 328, 1936.

(Aus dem Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen.)

Untersuchungen zur Morphologie und Biologie der Mycobakterien des Bodens.

Von

O. v. Plotho.

Mit 16 Textabbildungen.

(Eingegangen am 15. Juli 1942.)

Seit etwa 50 Jahren sind neben den pathogenen *Mycobakterien* eine große Zahl säurefester saprophytischer Formen beschrieben worden. Sie stammten aus den verschiedensten Quellen, und fast jeder dieser Organismen wuchs nach den Angaben der Autoren schnell und üppig auf allen gebräuchlichen Nährböden. Keiner besaß eine Pathogenität im eigentlichen Sinne, wenn auch starke Impfung bei den Versuchstieren Abszesse, vereinzelt sogar den Tod verursacht haben soll. Die Zahl der Originalbeschreibungen dieser säurefesten Stämme wuchs schnell, aber sie waren oft so unzureichend, daß es unmöglich war, die Bakterien wieder zu erkennen. Daher gab es in der Literatur eine erhebliche Anzahl, die unter dem Namen ihres Autors oder ihrer Herkunft umliefen und es war wahrscheinlich, daß manche unter verschiedenen Namen bekannte in Wirklichkeit die gleichen waren.

Das zeigte sich denn auch, als im Jahre 1896 *Lehmann* und *Neumann* zum ersten Male eine systematische Einordnung der *Mycobakterien* unternahmen. Für die aus Böden verschiedenster Herkunft stammenden Formen stellten sie auf Grund eingehender Studien an 13 Stämmen zwei Arten auf, die den Namen *Myc. lacticola* und *Myc. phlei* erhielten. Später fügten sie diesen beiden Arten zwei weitere hinzu, so daß in der 7. und bisher letzten Auflage ihrer bakteriologischen Diagnostik *Myc. eos* und *Myc. luteum* neben *Myc. lacticola* und *phlei* als Arten verzeichnet sind.

Die im folgenden mitgeteilten Untersuchungen wurden an 27 Stämmen dieser vier Arten durchgeführt, von denen ich 21 selbst aus Standorten verschiedenster Herkunft isolierte. Zu wiederholten Malen wurden aus einem Ansatz mehrere Stämme isoliert, doch werden offenbar gleiche nur einmal aufgeführt.

Isolierungsmethoden, Herkunft und systematische Einordnung der untersuchten Stämme.

Zur Isolierung wurden zwei verschiedene Methoden verwendet. Nach der von *Kersten* angegebenen sollen durch Zusatz von 10 bis 20% Antiformin nach einstündiger Einwirkung die Begleitorganismen weitgehend geschwächt bzw. abgetötet, und nur die *Mycobakterien* entwicklungsfähig sein. Ich behandelte das Ursprungsmaterial 1 Stunde lang mit einer 15%igen Antiforminlösung und strich nach sorgfältigem Auswaschen und Zentrifugieren auf Petrischalen mit Nähragar, dem 0,5% Dextrose zugesetzt war, aus. Nach der von *Söhngen* mitgeteilten Methode wird zur Isolation der *Mycobakterien* Paraffin, Benzin, Paraffinöl oder Petroleum als einzige C-Quelle dem Nährmedium zugesetzt. Bei den hier ausgeführten Isolierungen kam

ausschließlich flüssiger Nährboden in der von *Söhngen* angegebenen Zusammensetzung zur Verwendung (NH_4Cl 0,05%, K_2HPO_4 0,05%, $MgSO_4$ 0,02%, $CaCO_3$ 0,02%). Mit ihm wurden 500 ccm Erlenmeyerkolben bis zu 2 cm Höhe angefüllt und 1% Paraffin nach Erwärmen mit einer Pipette auf die Nährlösung getropft. Jeder Tropfen erkaltet sofort und schwimmt in Form eines kleinen Plättchens auf der Lösung. In den bei etwa 35° C gehaltenen Kulturen erscheint nach 14 bis 16 Tagen am Rande der Plättchen und auf ihrer Unterseite ein kleiner weißer bis gelblicher Belag, der häufig *Mycobakterien* enthält. Die Anreicherung der Rohkulturen ist ebenfalls von *Söhngen* beschrieben und erfolgte nach seinen Angaben.

Die Isolierungen wurden sämtlich im Herbst 1940 vorgenommen und zu anderen Jahreszeiten nicht wiederholt, da *Haag* keinen Unterschied im Ergebnis seiner Herbst- und Frühjahrsisolierungen feststellen konnte. Nach ihm erscheint die Verteilung der Boden-*Mycobakterien* in der Natur durchaus regellos, sowohl geographisch als auch jahreszeitlich.

Über den Erfolg der Isolierungsmethoden, die Herkunft und die Stellung der Stämme im System unterrichtet die Tabelle I.

Tabelle 1.

Nr. des Stammes	Stellung im System	Herkunft	Isoliermethode
1	*Myc. testudinis*	Sammlung des Rob. Koch-Instituts Berlin *	—
2	„ *lacticola var. perrugosum*	Grabenwasser	nach *Söhngen*
3	„ „ „ „	Sammlung des Hygienischen Instituts Göttingen *	—
4	„ „ „ „	dasselbe	—
5	„ „ „ „	Komposterde	nach *Söhngen*
6	„ „ „ „	Sammlung des Rob. Koch-Instituts Berlin	—
7	„ „ „ *planum*	Gartenerde	nach *Söhngen*
8	„ *phlei var. perrugosum*	Sammlung der biologischen Reichsanstalt Berlin *	—
9	„ „ „ „	dasselbe	—
10	„ „ „ *planum*	Komposterde	nach *Söhngen*
11	„ „ „ „	Tümpelwasser	„ *Kersten*
12	„ „ „ „	Grabenwasser	„ *Söhngen*
13	„ „ „ „	„	„ *Kersten*
14	„ *luteum*	Schlamm	„ *Söhngen*
15	„ *eos*	Walderde	„ „
16	„ „	Sekundärkolonie von Stamm 15	
17	„ „	frisches Heu	nach *Söhngen*
18	„ „	Ackererde	„ „
19	„ „	Schlamm	„ „
20	„ „	„	„ „
21	*Proactinomyces sp.*	Komposterde	„ „
22	„ „	Gartenerde	„ „
23	„ „	„	„ „
24	„ „	Walderde	„ „
25	„ „	Pfützenwasser	„ *Kersten*
26	„ „	Tümpelwasser	„ „
27	Atypische Form	Straßenstaub	„ *Söhngen*

* Den Herren Professoren *Lange*-Berlin und *Schütz*-Göttingen, sowie Herrn Oberregierungsrat *Stapp*-Berlin sage ich auch an dieser Stelle für die liebenswürdige Überlassung der Stämme meinen verbindlichsten Dank.

Ein Blick auf die Tabelle läßt sofort die Überlegenheit der Isolierungsmethode nach *Söhngen* erkennen. Unter 20 Proben wurden bei ihrer Anwendung nur in drei Ansätzen keine *Mycobakterien* gefunden. Das Antiforminverfahren erwies sich dagegen als weit unergiebiger. Unter der gleichen Anzahl von Proben gelang nur viermal die Herauszüchtung von *Mycobakterien*. Wenn *Kersten* seinerzeit von seiner Methode sagen konnte, daß sie als die sicherste „zur Züchtung der säurefesten Saprophyten angesprochen werden könne", so ist sie heute durch das *Söhngen*sche Verfahren weit überholt.

Die Übersicht über die Herkunft der Stämme zeigt von neuem das ubiquitäre Vorkommen der *Mycobakterien* im Boden, das von vielen Forschern festgestellt ist. Das Ursprungsmaterial besteht hier ausschließlich aus Bestandteilen des Bodens oder seiner unmittelbaren Abkömmlinge; auf Proben aus Milch, Butter, Wasserleitungen u. dgl. wurde verzichtet, da im Boden die Ursprungsstätte auch der in solchem Material gefundenen Bakterien liegen dürfte. Aus der geringen Zahl der Fehlansätze kann weiter auf den hohen Prozentsatz geschlossen werden, den die *Mycobakterien* unter der gesamten Mikroflora des Bodens einnehmen. Es ist wahrscheinlich, daß eine beträchtliche Zahl der in Bodenuntersuchungen als „Kokken" angegebenen Organismen in Wirklichkeit zur Familie der *Mycobakterien* gehören. Der Stamm 16 ist, wie in der Tabelle I vermerkt, aus Sekundärkolonien des Stammes 15 hervorgegangen. Etwa 4 Wochen nach seiner Isolierung entstanden auf seiner Kultur viele runde, weiße Kolonien, die sich nach ihrer Abimpfung korallenrot färbten. *Haag* beschreibt eine Reihe solcher Abtrennungen, bei den hier besprochenen Stämmen wurde das Phänomen nur einmal beobachtet.

Die Tabelle I enthält, der Einteilung von *Lehmann* und *Neumann* folgend, Vertreter der Arten *Myc. lacticola phlei, eos* und *luteum*. Die Stellung der beiden letztgenannten ist nicht unumstritten, da die amerikanischen Autoren sie nicht als Arten anerkennen. Amerikanische Forscher versuchten in neuerer Zeit die saprophytischen *Mycobakterien* durch Aufstellen von Standardmerkmalen zu klassifizieren. Dabei wurde zuerst von *Thomson* das Wachstum bzw. Nichtwachstum bei 47° C als Klassifikationsgrund angewandt. *Gordon* untersuchte dann 252 Stämme auf das Überleben bzw. Absterben bei einer Erwärmung auf 60° C während 1 Stunde. Sie teilte, *Thomson* folgend, ihre Kulturen in drei Gruppen ein, bei denen das Verhalten der Organismen diesen thermischen Faktoren gegenüber die Hauptbasis der Klassifikation darstellt. In der Arbeit von *Gordon* und *Hagan* wird diese Gruppeneinteilung beibehalten, die Unterteilung in Untergruppen aber vervollständigt durch Erweiterung der Untersuchung über das Verhalten der Bakterien in Lösungen mit verschiedenen Kohlenstoffquellen. Diese Einteilung übernimmt *Bergey* in der neuesten Auflage seines diagnosti-

schen Handbuchs. Sie zeigt in der Gruppe I (Wachstum bei 47° C, Absterben bei Erhitzen auf 60° C während 1 Stunde) eine große Einheitlichkeit, da alle Stämme bis auf vier (die die Untergruppe I b bilden) *Lacticola*-Stämme vom Typus *perrugosum* sind. In der Untergruppe I b erscheinen die *Lacticola*-Stämme vom Typus *planum*. Die gleiche Einheitlichkeit weist die Gruppe III auf (Wachstum bei 47° C, Überleben bei Erhitzen auf 60° C während 1 Stunde). Alle Stämme in ihr sind *Phlei*-Stämme. Die Gruppe II dagegen (kein Wachstum bei 47° C, Absterben bei Erhitzen auf 60° C während 1 Stunde) ist heterogener. Sie umfaßt alle sogenannten Kaltblüterbakterien, in der Untergruppe III c erscheint *Myc. testudinis*. Das Genus *Mycobacterium* wird also von den amerikanischen Forschern auch heute noch begrenzt durch die streng säurefesten Bakterien. Bei den Boden-*Mycobakterien* erscheinen nur *Myc. lacticola* und *Myc. phlei* als Arten, ebenso wie *Winslow* und Mitarbeiter nur diese beiden Arten gelten lassen wollten. *Bergey* reiht in der 5. Auflage seines Handbuches (1939) *Myc. eos* bei den *Proactinomyceten* ein unter der Bezeichnung *Proactinomyces rubropertinctum*, während er es in der 1. Auflage (1923) als *Serratia rubropertinctus* bezeichnet. Auch *Jensen* (1934) stellt *Myc. eos* zu den *Proactinomyceten*. In Einzellkulturen ähnelt aber *Myc. eos* in keiner Weise den *Proactinomyceten*, und nach Beobachtung der Entwicklung solcher Einzelindividuen ist die Zuordnung zu den *Proactinomyceten* sicher nicht zu rechtfertigen, was aus den weiter unten folgenden Angaben über das mikroskopische Bild klar hervorgeht. Das gleiche gilt für *Myc. luteum*, das *Bergey* ebenfalls als wahrscheinlich zu den *Proactinomyceten* gehörend bezeichnet. Es sei aber, so heißt es weiter, zu ungenügend beschrieben, um es mit Sicherheit klassifizieren zu können. *Myc. luteum* weist aber in Einzellkulturen ebenfalls keinerlei Merkmale auf, die seine Einreihung bei den *Proactinomyceten* rechtfertigen könnten, es erscheint vielmehr, wie auch *Haag* feststellte, als eine gute Art der *Mycobakterien*. Vielleicht gelingt es einmal, auch auf serologischem Wege zu einer zweifelsfreien Einordnung der umstrittenen Arten zu kommen (*Ebina*).

Die Stämme 21 bis 26 stellen dagegen zweifellos Übergangsformen zwischen *Mycobakterien* und *Actinomyceten* dar, die als *Proactinomyceten* bezeichnet werden können. Sie ähneln sämtlich dem von *Gray* und *Thornton* (1928) erstmalig als *Myc. agreste* beschriebenen Organismus, der von *Jensen* (1931) als *Proactinomyces agrestis* bezeichnet wird; auch *Bergey* wählt 1939 die gleiche Benennung, während er ihn in der 3. Auflage seines Handbuchs 1930 als *Actinomyces agrestis* bei den *Actinomyceten* unterbringt.

An letzter Stelle ist in der Tabelle I als atypische Form ein Bakterium aufgeführt, das sich in die obigen Arten nicht ohne

weiteres einordnen ließ. Seine Stellung wird bei der Betrachtung seiner Morphologie diskutiert werden.

Makroskopisches Bild der Stämme unter verschiedenen Umweltbedingungen.

Einen Überblick über die Beschaffenheit, Konsistenz und Färbung der einzelnen Stämme, sowie ihr Verhalten unter anaeroben und sauerstoffarmen, aber kohlensäurereichen Bedingungen vermittelt Tabelle II.

Was die Beschaffenheit und Konsistenz der Kolonien betrifft, so fällt in der Tabelle II der Unterschied im Wachstumscharakter zwischen gefalteten (*perrugosum*) und glatten (*planum*) Modifikationen der Arten *Lacticola* und *Phlei* sofort auf. Die perrugosumartigen Formen sind gekennzeichnet durch ein mattes, trockenes, brüchiges, mehr oder weniger stark radiär gefaltetes Wachstum; zähe oder gallertartige Exsudate fehlen bei ihnen. Bei einer Temperatur von 35° C werden am 4. bis 5. Kulturtag die jungen, durchscheinenden Kolonien dicker und undurchsichtig, und die Faltung setzt ein. Die glatten Vertreter bilden dagegen von vornherein meist glänzende, feuchte und ungefaltete Kolonien, sie sondern zähe Umsetzungsprodukte in mehr oder weniger großer Menge ab und daher sind ihre Kolonien von teigiger, wachsartiger bis weicher Beschaffenheit. Auch im Alter zeigen sie die gleichen Eigenschaften. Dieser Unterschied im Habitus ist auf den verschiedensten Nährböden festzustellen. Er ist vorhanden auf Fleischextrakt-Pepton-Agar mit und ohne Zusatz einer besonderen Kohlenstoffquelle, wie auch auf Agar von bekannter Zusammensetzung, z. B. dem Asparaginagar nach *Jensen* (1934)[1]. Am wenigsten ausgeprägt erschien er auf einem als Hefekochsaft bezeichneten Agar[2], der an sich einen ausgezeichneten Nährboden darstellt, die Konsistenz der Kolonien aber stark beeinflußt, indem er ihre Brüchigkeit weitgehend aufhebt. Ein Unterschied zwischen gefaltetem und glattem Wachstum besteht aber auch auf ihm.

Die mit *perrugosum* und *planum* bezeichneten Modifikationen entsprechen den Benennungen „R-Form“ und „S-Form“ der amerikanischen Forscher, die sich von „rough Type“ und „smooth Type“ herleiten. Die willkürliche Aufspaltung in diese beiden Typen soll auf bestimmten Nährböden gelingen (*Gildemeister*), Versuche nach dieser

---

[1] Dextrose 1%, Asparagin 0,1%, K_2HPO_4 0,1%, $MgSO_4$ 0,05%, NaCl 0,05%. — [2] 100 g Bäckerhefe + 1 Liter Wasser 2 Stunden bei 25° C stehenlassen, 15 Minuten bei 2 Atm. Druck sterilisieren, absetzen. Zusammensetzung des Nährbodens: Hefekochsaft 10 ccm, Aqua dest. 90 ccm, Mannit 2%, K_2HPO_4 0,02%, KH_2PO_4 0,03%, $MgSO_4$ 0,02%, NaCl 0,01%, $CaSO_4$ 0,0005%.

Tabelle II.

Stamm	Beschaffenheit der Kultur auf festem Nährboden	Farbe	Gelatinestich	Kultur in O-armer, aber CO_2-reicher Atmosphäre	Kultur unter Sauerstoffausschluß
1. *Myc. testudinis*	trocken, knotig, im Alter wulstige Faltung	anfangs cremefarben, später gelblich	keine Verflüssigung	kein Wachstum	kein Wachstum
2. *Myc. lacticola var. perrugosum*	brüchig, trocken matt, radiäre Faltung	anfangs weißgelb, später tiefgelb	dasselbe	Wachstum gut, Färbung und Beschaffenheit normal	kein Wachstum
3. ,, ,, ,, ,,	dasselbe	dasselbe	dasselbe	dasselbe	kein Wachstum
4. ,, ,, ,, ,,	,,	,,	,,	,,	,, ,,
5. ,, ,, ,, ,,	brüchig, trocken matt. sehr feine Faltung	anfangs weißlich, später gelb	,,	,,	,, ,,
6. ,, ,, ,, ,,	brüchig, trocken matt, grobe Faltung	anfangs hell, später dunkelgelb	,,	Wachstum schlecht, Farbstoffbildung unterdrückt	,, ,,
7. *Myc. lacticola var. planum*	teigig, trocken matt, anfangs ungefaltet, später geringe Faltung	weißlich, im Alter ebenso	dasselbe	Wachstum gut, Färbung und Beschaffenheit normal	kein Wachstum
8. *Myc. phlei var. perrugosum*	mattglänzend, wachsartig, radiäre Faltung	ziegelrot	dasselbe	Wachstum gut, Farbstoffbildung gering, ungefaltet	schwaches Wachstum, völlig farblos
9. ,, ,, ,, ,,	dasselbe	intensiv gelb	dasselbe	dasselbe	kein Wachstum
10. *Myc. phlei var. planum*	ungefaltet, weich, glänzend	mattrot	,,	Wachstum gut, Farbe gelb	,, ,,
11. ,, ,, ,, ,,	,, ,, ,,	hellrot	,,	Wachstum gut, Farbe blaß rosa	,, ,,
12. ,, ,, ,, ,,	,, ,, ,,	gelbrot	,,	Wachstum gut, Farbe gelb	,, ,,
13. ,, ,, ,, ,,	,, ,, ,,	rot	,,	Wachstum gut, Farbe hellrot	,, ,,

Tabelle II (Fortsetzung).

Stamm	Beschaffenheit der Kultur auf festem Nährboden	Farbe	Gelatinestich	Kultur in O-armer aber CO_2-reicher Atmosphäre	Kultur unter Sauerstoffausschluß
14. *Myc. luteum*	sahnig, glänzend	intensiv gelb	keine Verflüssigung	Wachstum gut, Färbung gut	kein Wachstum
15. *Myc. eos*	butterartig, mattglänzend, leicht gefaltet	intensiv rot	dasselbe	Wachstum gut, Farbstoffbildung gehemmt	„ „
16. „ „	dasselbe	korallenrot	dasselbe	dasselbe	kein Wachstum
17. „ „	ungefaltet	intensiv rot	„	„	„ „
18. „ „	butterartig, mattglänzend, leicht gefaltet	blaßrot	„	„	„ „
19. „ „	mattglänzend, ungefaltet, butterartig	rot	„	„	„ „
20. „ „	butterartig, leicht gefaltet, mattglänzend	rot	„	„	„ „
21. *Proactinomyces sp.*	sehr feucht, glänzend, Kolonierand verästelt	hellrot	dasselbe	Wachstum gut, Farbe gelb	schwaches Wachstum, völlig farblos
22. *Proactinomyces sp.*	sehr feucht, glänzend	gelbrot	dasselbe	dasselbe	kein Wachstum
23. „ „	dasselbe	hellrot	„	„	„ „
24. „ „	glatt, sehr feucht, Kolonierand verästelt	gelbrot	„	„	„ „
25. „ „	dasselbe	rot	„	„	schwaches Wachstum, völlig farblos
26. „ „	„	hellrot	dasselbe	dasselbe	dasselbe
27. Atypische Form	teigig, geringe Faltung, mattglänzend	fleischfarben	„	Wachstum gut, cremefarben	kein Wachstum

In der Tabelle beziehen sich die Angaben in der 2., 3., 5. und 6. Vertikalreihe für die *Lacticola*-Stämme auf Nähragar, dem 3% Glycerin als C-Quelle zugesetzt ist, für die übrigen Stämme auf Nähragar der gleichen Zusammensetzung mit 1% Dextrosezusatz an Stelle des Glycerins. Die Nährböden wurden mit NaOH auf ein p_H von 7 gebracht. Alle Kulturen wuchsen bei einer Temperatur von 35° C, ausgenommen diejenigen von *Myc. testudinis*, die bei 22° gehalten wurden, da der Stamm am besten an diese Temperatur angepaßt zu sein schien. *Br. Lange* zeigte, daß es ohne große Schwierigkeit gelingt, alle Kaltblüterbazillen an verschiedene Temperaturen anzupassen.

Richtung wurden hier nicht angestellt. Der Stamm 7 verkörpert keinen ausgesprochenen S-Typ, er ist, wie die Tabelle angibt, in älteren Kulturen, in geringem Maße gefaltet, in Flüssigkeitskulturen bildet sich ein dünnes Oberflächenhäutchen, während die ausgesprochenen S-Typen keine Neigung zeigen, an die Oberfläche zu gehen. Die Kulturen von Stamm 7 sind jedoch weich und das Ausbleiben des Farbumschlags beim fortschreitenden Wachstum, worauf sofort eingegangen werden soll, ist bezeichnend für den S-Typ der Art; der Stamm stellt also eine Zwischenform zwischen beiden Modifikationen dar. Bei den *Eos*- und *Luteum*-Stämmen fehlt die besprochene Aufteilung in die zwei Modifikationen.

Die Farbstoffbildung ist bei einigen Stämmen sehr ausgesprochen, was aus der Tabelle II deutlich hervorgeht. Von Dextrose als C-Quelle wird sie gefördert, Glycerin ist in dieser Beziehung weniger günstig, Asparagin unterdrückt die Farbstoffbildung, ebenso anorganische Stickstoffquellen. Am geringsten ist die Färbung der *Lacticola*-Stämme. Der für die gefalteten Formen in der Tabelle verzeichnete Farbumschlag der jungen, weißlichen, bis leicht gelben Kolonien in tiefer gelb und dunkelgelb gefärbte im Verlauf des weiteren Wachstums ist sehr charakteristisch. *Gordon* fand bei Stämmen, die außerhalb dieser Gruppen stehen, nur ein einziges Mal den gleichen Umschlag. Bei Zimmertemperatur entwickelt sich nach einer Kulturdauer von 4 bis 5 Wochen immer ein mehr oder weniger intensives Gelb, das unter den untersuchten Stämmen bei Stamm 6 fast zu einem Ockergelb wird. Bei dem glatten *Lacticola*-Stamm findet dagegen, wie bereits erwähnt, dieser Umschlag nicht statt, seine Kolonien besitzen von vornherein eine weißliche Färbung und behalten sie während der ganzen Kulturzeit. Weitaus kräftiger gefärbt sind alle Stämme der übrigen Gruppen. Unter ihnen gibt es nicht wenige, die schöne, intensive Rot- und Gelbtöne besitzen. Die von *Krassilnikow* (1934 und 1938) beschriebenen grünlichen bis braunen Farbtöne fehlen allerdings bei den untersuchten Organismen, sie scheinen verhältnismäßig selten aufzutreten. Überall finden sich die Farbstoffe aber nur als Eigenfarbe, eine Verfärbung des Agars fand nie statt, auch nicht bei *Myc. testudinis*, für das *Haag* eine solche angibt. Die Bildung der Eigenfarbe aber war bei allen von mir untersuchten Stämmen während der ganzen Untersuchungszeit auf den gleichen Nährböden und unter sonst gleichen Bedingungen konstant.

Zur Entscheidung der Frage über den Einfluß des Faktors „Licht“ auf Auftreten und Intensität der Farbstoffbildung wurden eine Reihe von Versuchen mit den kräftigsten Farsbstoffbildnern durchgeführt. Die Kulturen wuchsen bei Zimmertemperatur auf Nähragar mit 1 % Dextrose, das p_H betrug 6,8 bis 7,0; die belichteten standen vor einem Nordfenster, so daß sie direktem Sonnenlicht nicht ausgesetzt waren. Die Ergebnisse sind in der Tabelle III zusammengefaßt.

Tabelle III.

Stamm	3 Tage alte Kulturen		12 Tage alte Kulturen		28 Tage alte Kulturen	
	belichtet	unbelichtet	belichtet	unbelichtet	belichtet	unbelichtet
8	blaßrot	blaßrot	ziegelrot	hell ziegelrot	ziegelrot	ziegelrot
14	gelb	blaßgelb	gelb	hellgelb	tiefgelb	gelb
15	blaßrot	blaßrot	rot	blaßrot	hochrot	schwächer rot
16	schwach rot	schwach rötlich	korallenrot	blaßrosa	korallenrot	,,
17	blaßrot	blaßrot	intensiv rot	blaßrot	hochrot	,,
18	schwach rot	schwach rot	rot	blaßrosa	rot	,,

Die Zusammenstellung läßt erkennen, daß die Färbung sowohl in Tageslicht- als auch in unbelichteten Kulturen frühzeitig auftritt, daß aber ihre Intensität bereits in jungen Kulturen abhängig ist vom Zutritt des Lichtes (Stamm 14 und 16). Diese Abhängigkeit tritt bei den 12 Tage alten Kulturen sehr deutlich in die Erscheinung. Alle Tageslichtkulturen sind bedeutend intensiver gefärbt als die unbelichteten. Auch beim Abschluß der Versuchsreihe ist dieser Unterschied noch deutlich wahrnehmbar, dem Licht kommt also offenbar ein starker Einfluß auf die Farbstoffbildung zu. Dieses Ergebnis stimmt überein mit Beobachtungen an anderen Mikroorganismen, die an der Luft oder in oberflächlichen Schichten des Bodens leben und daher den Lichtstrahlen ausgesetzt sind und die, wenn sie bei Lichtabschluß kultiviert werden, die Fähigkeit der Farbstoffbildung geringer entwickeln oder sogar verlieren (*Danilow*, *Ebeling*). Vor kurzem veröffentlichte *Barbudieri* Beobachtungen an einem, einen grau-violetten Farbstoff bildenden, nichtpathogenen *Mycobacterium*, das ebenfalls den Farbstoff im diffusen Tageslicht, nicht aber im ,,Halbdunkel" seines ursprünglichen Standorts entwickelte. Er schreibt den violetten und ultravioletten Teilen des Sonnenlichtspektrums hierbei die größte Wirkung zu.

Über die Natur der Farbstoffe von *Mycobakterien* liegt eine neuere russische Arbeit mit englischer Zusammenfassung vor (*Kriss* und *Koreniako*). Die Verfasser erreichten die Differenzierung der Pigmente durch die von dem russischen Botaniker *Tswett* 1906 erstmalig veröffentlichte Ausführungsform der Adsorptionsanalyse, nach der sich die einzelnen Komponenten auf Grund ihrer verschieden starken Adsorption an ein farbloses Adsorbens als farbige Zonen „chromatographisch" erkennen lassen. (Zusammenfassende Darstellung bei *Zechmeister* und *Cholnoky*.) *Kriss* und *Koreniako* unterteilen die Farbstoffe der *Mycobakterien* vorläufig in 3 Gruppen:

1. Farbstoffe, löslich in Wasser, Alkohol und anderen organischen Lösungsmitteln.
2. Farbstoffe, unlöslich in Wasser, löslich in Alkohol und anderen organischen Lösungsmitteln.
3. Farbstoffe, unlöslich in Wasser, unlöslich in Alkohol und anderen organischen Lösungsmitteln.

In die Gruppe 1 fällt ein violetter Farbstoff von *Myc. cyaneum Krassilnikow*, zur Gruppe 2 gehören die Carotide verschiedener Stämme, das Phytocoll des *Tuberkelbazillus* und die Pigmente von *Myc. citreum Krassilnikow*, der Gruppe 3 entspricht ein grüner, fest an das Zellplasma gebundener Farbstoff von *Myc. viridis Tauson*.

Die Methode der chromatographischen Adsorption wurde besonders von *H. Brockmann* weiterentwickelt, der in der Hauptsache Aluminiumoxyd als Adsorbens verwendete, das sich durch ein ausgeprägtes Adsorptionsvermögen für viele Stoffklassen auszeichnet, welches aber weitgehend abhängig ist von der Art der Gewinnung (*Holmes*) und dem Wassergehalt des Oxyds. *Brockmann* regte daher vor einigen Jahren die Herstellung eines Aluminiumoxyds mit standardisiertem Adsorptionsvermögen an, und ein solches wird heute von der Firma *Merck* unter der Bezeichnung „Aluminiumoxyd zur Adsorption nach *Brockmann*“ in den Handel gebracht. Das Präparat wurde zu den weiter unten mitgeteilten Versuchen benutzt. Es besitzt den Aktivitätsgrad III, was durch Prüfung mit den entsprechenden Farbstoffgemischen vor seiner Anwendung nachgeprüft wurde (Methode von *Brockmann* und *Schodder*).

Da bei den hier untersuchten Stämmen violette und grüne Farbstoffe nicht vorkommen, so war es wahrscheinlich, daß die Farbstoffe der pigmentierten Stämme in die von *Kriss* und *Koreniako* aufgestellte Gruppe 2 gehörten. Es zeigte sich denn auch, daß sie sämtlich in Wasser unlöslich waren, daß aber alle leicht mit absolutem Methylalkohol extrahiert werden konnten. Zur Ausführung der Versuche wurden die Kulturen der Stämme 8, 14, 17 und 20, die die kräftigste Färbung zeigten, vom Nährboden abgehoben. Eine Zerreibung der Zellen mit Kieselgur, die *Kriss* und *Koreniako* empfehlen, erwies sich als unnötig, da die Farbstoffe aller Stämme auch ohne sie leicht in den Methylalkohol gingen. Dieser färbt sich bei den Stämmen 17 und 20 dabei orangerot, bei dem Stamm 8 entsteht eine hellgelbe Farblösung, der Farbstoff des Stammes 14 geht mit tiefgelber Farbe in den Alkohol über. Eine Adsorption an Aluminiumoxyd ist aber nur aus Lösung in Benzin, Petroläther oder Benzol möglich, daher mußten die Farbstoffe aus der Methanollösung in eine Lösung dieser Substanzen übergeführt werden. Zur Überführung wurde eine Lösung von Petroläther und Benzol im Verhältnis 4 : 1 gewählt, in die die Farbstoffe aus der Methanollösung aber nur nach starker Verdünnung mit Wasser übertraten. Das Chromatogramm des Stammes 14 besteht aus einer gelben und einer darunterliegenden schmalen grünen Zone, der Farbstoff des Stammes 8 konnte nicht identifiziert werden, weil er wahrscheinlich zu stark verdünnt war, die Chromatogramme der Stämme 17 und 20 zeigen eine orangefarbene Zone, sie enthalten Carotin.

Dieses Ergebnis wurde bestätigt durch die von *Molisch* angegebene Methode zum Nachweis von Carotin. Hierzu wurde Material der Stämme 8, 14, 17, 20 und 18 in 40 %igem Alkohol, der 20 % Kaliumhydroxyd enthält, gelegt und die Reagensgläschen mit Paraffin luftdicht

verschlossen, um die Absorption von atmosphärischer Kohlensäure durch die Kalilauge zu verhindern. Die Versuchsröhrchen standen mehrere Tage bei 22° C im Dunkeln. Stamm 17 und 20 zeigten darauf prächtige Carotinkristalle. Sie sind braunorange und bilden teilweise einzelne Nadeln, teilweise große Stern- und büschelförmige Aggregate von solchen. Nach vollständigem Auswaschen der Kalilauge mit destilliertem Wasser und möglichst vollständigem Entzug des Wassers im Exsikkator färbten sich die Kristalle mit konzentrierter Schwefelsäure und konzentrierter Salpetersäure tief indigoblau. Bei Anwendung von Salpetersäure verschwand die Farbe jedoch bald, auf Zusatz von Wasser werden die Kristalle sofort entfärbt. Bei Stamm 18 lag der Farbstoff nur in Form von zahlreichen gelben Tropfen vor. Diese färbten sich nach Auswaschen der Kalilauge und Entfernen des Wassers ebenfalls mit den genannten Reagentien tief blau. Bei den Stämmen 8 und 14 wurden keine Carotinkristalle gefunden.

Bei der Durchsicht der 4. Vertikalreihe der Tabelle II ergibt sich, daß keiner der untersuchten Stämme Gelatine verflüssigt. Alle wachsen längs dem oberen Teil der Impfrinne üppiger als an ihrem unteren Ende, was zweifellos mit dem Sauerstoffbedürfnis der Organismen zusammenhängt.

Die Ergebnisse der 5. Vertikalreihe der Tabelle II gehen zurück auf eine Atmosphäre vermehrter Kohlendioxyd- und verminderter Sauerstoffspannung.

Sie wurde hergestellt auf die kürzlich von *Kunz* angegebene einfache und billige Weise, indem in einem luftdicht verschließbaren Gefäß, nach Einstellen der beimpften Schrägagar-Reagensgläser, eine Paraffinkerze angezündet wird. Nach kurzem Öffnen des Deckels, das ein Entweichen eines Teiles der erwärmten und daher ausgedehnten Luft ermöglicht, wird das Gefäß luftdicht verschlossen. Die Kerze erlöscht bald, es hat sich in dem Gefäß Kohlendioxyd und Wasser gebildet, während der Sauerstoff zum großen Teil verschwunden ist.

Die auf diese Weise vorgenommene Veränderung in der Zusammensetzung der umgebenden Luftschicht scheint jedoch für die Entwicklung der *Mycobakterien* von geringer Bedeutung zu sein. Alle *Lacticola*-Stämme, bis auf den Stamm 6, der nur schlecht vorwärts kam, wuchsen gut, Färbung und Beschaffenheit der Kolonien waren ebenfalls ziemlich normal. Auch die *Phlei*-Stämme entwickelten sich gut, Stamm 8 zeigt aber eine Unterdrückung der Faltung, außerdem ist die Farbstoffbildung gehemmt. Das gleiche Bild unterdrückter Farbstoffbildung weisen auch alle übrigen Kulturen auf, während das Wachstum durch die veränderten Umweltsbedingungen weniger beeinflußt wird.

Um das Verhalten der Bakterien unter streng anaeroben Bedingungen zu prüfen, wurde ein luftdicht verschlossenes Kulturgefäß,

das die beimpften Versuchsröhrchen enthielt, an der Wasserstrahlpumpe so weitgehend evakuiert, daß es unter Berücksichtigung eventuell eingetretener kleiner Fehler nur noch einen Sauerstoffpartialdruck von der Größenordnung etwa eines Millimeters enthielt. Unter diesen Bedingungen fand, wie die 6. Vertikalreihe der Tabelle II zeigt, bei fast allen Stämmen nicht die geringste Entwicklung statt. Nur bei 3 Stämmen hatte ein sehr schwaches Wachstum eingesetzt. Der unter allen Verhältnissen kräftig und schnell wachsende Stamm 8 wies eine geringe Entfaltung auf, die bei den Stämmen 21 und 24 noch kümmerlicher war. Zudem ließen alle drei Kulturen auch nicht die geringste Spur einer Färbung erkennen. Trotz der schwachen und unnormalen Entwicklung der drei erwähnten Stämme dürfen aber die *Mycobakterien* als streng aerobe Organismen bezeichnet werden, jedenfalls ist zu ihrer normalen Ausbildung die volle Sauerstoffspannung der atmosphärischen Luft notwendig.

Mikroskopische Untersuchung der Arten.

Es ist bekannt, daß die *Mycobakterien* im mikroskopischen Bild einen verwirrenden Pleomorphismus aufweisen. Lange und kurze, gebogene und gerade, ungleich dicke, parallel und winkelig gelagerte Stäbchen, kokkoide Formen, völlig sphärisch erscheinende Individuen sind bei entsprechender Vergrößerung bei willkürlich einer jüngeren Agarkultur entnommenen Probe fast in jedem Gesichtsfeld erkennbar. Dazu kommt, daß die Art und Reichhaltigkeit des Nährsubstrats und die Häufigkeit des Überimpfens den Habitus der Stämme weitgehend verändern können, viel stärker als das bei anderen Bakterien der Fall zu sein pflegt. Häufig überimpfte Kulturen von guten Medien bestehen aus verhältnismäßig langen Stäbchen, während bei seltenerer Überimpfung und ärmeren Nährböden gleichaltrige Kulturen viel gedrungenere Formen besitzen, die frühzeitig in die Kokkenform übergehen. Endlich finden sich bei vielen *Mycobakterien* in verschiedenen Altersstadien verzweigte Stäbchen bzw. Fäden, die das mikroskopische Bild noch mehr verwirren.

Jensen (1934) teilte die *Mycobakterien* in 2 Gruppen ein und ermöglichte dadurch auf einfache Weise eine erste Orientierung über die Zugehörigkeit eines neu aufgefundenen Stammes zu einer bestimmten Art. Die erste Gruppe, *Subgenus A*, ist nach ihm gekennzeichnet durch vorwiegend parallele Lagerung der Stäbchen, sogenanntes Pallisadenwachstum. Es wurde zuerst von *Graham Smith* beobachtet und als „slipping growth“ beschrieben. Diese Benennung ist sehr bezeichnend, denn nach der Teilung gleiten die Tochterzellen an der Ausgangszelle vorbei, wie das die Abb. 1 recht gut erkennen läßt. Bei Wiederholung dieses Vorgangs entstehen dann parallele Bündel von Zellen, die die Bezeichnung als Pallisadenwachstum rechtfertigen. Die zweite Gruppe bezeichnete *Jensen* als *Subgenus B*. Sie zeigt zumeist winklige Lage der Einzelstäbchen, das *Hill* „snapping growth“ nannte. Bei diesem

Wachstumsmodus stellt sich die Tochterzelle sehr schnell (snapping!) in einen Winkel zur Ausgangszelle und behält diese Lagerung, die sehr charakteristisch für die Kulturen der meisten *Mycobakterien* ist, bei.

Bei allen von mir untersuchten Organismen finden sich die beiden Extreme gemischt, womit ich die Angaben von *Jensen* bestätigen konnte; jedoch herrscht bei den *Lacticola*-Stämmen, wie beim humanen *Tuberkelbazillus*, Pallisadenwachstum vor (*Gardner*). Im tuberkulösen Sputum findet sich allerdings, wie ich häufig feststellen konnte, meist winkelige Lage der Stäbchen, was gut zu der Feststellung *Oerskows* (1935) stimmt, daß das Wachstum des *Tuberkelbazillus* mit Winkelwachstum beginnt, das jedoch in Kultur durch gleitendes Wachstum abgelöst wird. Jedenfalls ähneln die Kulturen des humanen *Tuberkelbazillus* und die der *Lacticola*-Stämme einander in hohem Maße. Bei den übrigen Arten findet sich vorwiegend der Wachstumsmodus von *Jensens Subgenus B*, das Winkelwachstum, wenn auch bei *Myc. luteum* in jungen Kulturen nicht selten parallele Lagerung der Stäbchen angetroffen wird. In älteren überwiegt aber auch bei dieser Art entschieden das Winkelwachstum. Dieses tritt bei den *Phlei*- und *Eos*-Stämmen auch in jungen Kulturen stark in den Vordergrund.

In der Literatur nehmen ohne Zweifel Erörterungen über die Verzweigung der *Mycobakterien* die erste Stelle ein. Die Beobachtungen über angeblich reich verzweigte Formen stammen jedoch großenteils von älteren Autoren (*Metschnikow, Maffuci, Coppen Jones, Bruns*), die ihre Untersuchungen an mit Carbolfuchsin gefärbten Präparaten vornahmen. Wenn zudem die mikroskopische Vergrößerung unzureichend ist, was häufig der Fall war, so ist eine genaue Beobachtung und Beurteilung unter diesen Verhältnissen kaum möglich. Auf das Konto der benutzten geringen Vergrößerung (750) sind wahrscheinlich auch die Angaben *Oerskows* (1932) zu setzen, der zahlreiche Verzweigungen bei den *Mycobakterien* feststellte. *Jensen* (1934) unterzog ebenfalls die Verzweigung einer genauen Prüfung. Er charakterisiert in dieser Beziehung *Myc. lacticola*, indem er sagt: „Wenn überhaupt, so ganz selten Verzweigung". Ebenso fand er bei zwei *Phlei*-Stämmen „selten Verzweigung". *Wykoff* und *Smithborn*, sowie *Wykoff* in zwei weiteren Arbeiten, setzten den Film bei Untersuchungen an *Myc. phlei* und mehreren *Kaltblüterbakterien* sowie einem nicht säurefesten Stamm ein und fanden, daß verzweigte Stäbchen gelegentlich vorkämen in Kulturen des glatten und häufiger in Kulturen des gefalteten Typs. Aber die Vergrößerung, bei der sie diese Beobachtungen machten, betrug nur 350! In einer sorgfältigen neueren Arbeit untersuchten *Carter* und *Hastings* mehrere saprophytische *Mycobakterien* sowie einen Stamm von *Myc. gallinaceum* in Einzellkulturen, die mit dem Mikromanipulator isoliert wurden. Bei Beobachtungen im hängenden Tropfen mit 1425facher Vergrößerung fanden sie niemals Verzweigung. Nur bei 440facher Vergrößerung sahen sie beim glatten Typ von saprophytischen Bakterien Formen, die als verzweigt angesprochen werden konnten, die sie aber als pseudoverzweigt bezeichneten.

Ein Überblick über die Literatur ergibt also kein klares Bild über die Morphologie der Organismen.

Um zu einem gesicherten Urteil zu gelangen, wurde zunächst versucht, Bakterienmaterial aus Zonen gleicher Altersstufen zu untersuchen. Zu diesem Zwecke wurden Petrischalen nur in der Mitte der Platte mit möglichst wenig Material beimpft (*Piekarski*). Die glatten Formen wuchsen dann konzentrisch um die Impfstelle herum und es konnten Präparate aus den Zonen annähernd gleichen Alters hergestellt werden. Im Mikroskop wies aber auch jedes Gesichtsfeld von „gleichaltrigen" Bakterien eine Vielfalt von Erscheinungsformen auf und bei den gefalteten Typen ließ sich die geschilderte Methode überhaupt nicht verwenden, weil „gleiche" Alterszonen bei ihnen in der einfachen

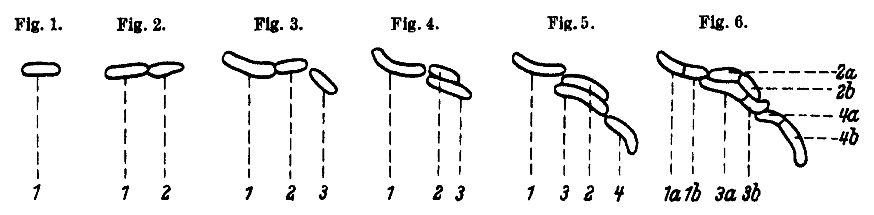


Abb. 1. Entwicklung einer Einzellkultur von Stamm 4.
Fig. 1 = Ausgangsstäbchen; Fig. 2 = Entwicklungsstadium 6 Stunden nach der Impfung; Fig. 3 = Entwicklungsstadium 11 Stunden nach der Impfung; Fig. 4 = Entwicklungsstadium 14 Stunden nach der Impfung; Fig. 5 = Entwicklungsstadium 24 Stunden nach der Impfung; Fig. 6 = Entwicklungsstadium 31 Stunden nach der Impfung.

Weise wie bei den glatt wachsenden Bakterien nicht feststellbar sind. Daher erschien es aussichtslos, aus Vielzellkulturen überhaupt eine sichere Beurteilung der Entwicklung von *Mycobakterien* zu erreichen. Es wurde deshalb ganz davon abgesehen, Vielzellkulturen zur Untersuchung der morphologischen Verhältnisse heranzuziehen.

Die im folgenden mitgeteilten Ergebnisse gründen sich ausschließlich auf eine große Zahl von Beobachtungen an Einzellkulturen. Diese wurden zum Teil mit dem Mikromanipulator isoliert, zum Teil wurde zur Untersuchung einzelner Zellen die Deckglaskulturmethode nach *Fortner* herangezogen, die zur fortlaufenden Kontrolle des Wachstums einzelner Zellen auch unter Verwendung stärkster Vergrößerungssysteme vorzüglich geeignet ist.

Von den untersuchten Organismen lieferte Stamm 4, der als erster besprochen sein mag, sehr charakteristische Bilder.

Abb. 1 zeigt die Entwicklung einer Einzellkultur dieses Stammes auf dem oben erwähnten Hefekochsaftagar, der mit NaOH auf das p_H 7 eingestellt war. Die Kulturtemperatur betrug 28° C, die Vergrößerung 1080. Die Beobachtungen wurden während der Tagesstunden in Abständen von 40 bis 60 Minuten wiederholt. Die Fig. 1 der Abb. 1 stellt das Ausgangsstäbchen dar, Fig. 2 das erste Entwicklungsstadium, das 6 Stunden nach der Impfung entstand. 5 Stunden später hatte Stäbchen 2 sich von neuem geteilt (Fig. 3), nach weiteren

3 Stunden bot die kleine Kolonie das Bild der Fig. 4. Stäbchen 3 hatte sich verlängert und fast ganz unter das Stäbchen 2 geschoben. 24 Stunden nach der Impfung hatte Stäbchen 3 sich ebenfalls geteilt und alle hatten sich merklich verlängert (Fig. 5). 7 Stunden später ließen sämtliche Stäbchen Teilungsstadien erkennen (Fig. 6), die auch in der photographischen Wiedergabe der Beobachtungsreihe deutlich zu erkennen sind (Abb. 2). Die junge Kolonie hatte also bis zu dem hier wiedergegebenen Stadium 31 Stunden zu ihrer Ausbildung gebraucht. Die weitere Entwicklung vollzog sich bedeutend schneller und die Verfolgung der Teilung der einzelnen Stäbchen war nicht mehr möglich. In den ersten 24 Stunden hatten sich die Stäbchen viermal geteilt, so daß die durchschnittliche Teilungszeit 6 Stunden betrug. *Carter* und *Hastings* sprechen von einer durchschnittlichen Teilungszeit von „ungefähr 5 Stunden", was mit den hier beobachteten Zeiten ziemlich gut übereinstimmt. Aber diese Zahlen besagen nicht viel, denn die ersten wahrnehmbaren Veränderungen auf neuem Substrat hängen ab von der Lage der Einzelstäbchen zueinander. Je isolierter ein Stäbchen liegt, um so länger ist die Latenzzeit bis zum Wachstumsbeginn auf dem neuen Medium. Liegen die Stäbchen relativ dicht nebeneinander, so beginnt die Teilung schneller und das Teilungsintervall ist kürzer. Das gilt für die Kulturen aller Stämme.



Abb. 2. Einzellkultur von Stamm 4: 31 Stunden alt, Vergrößerung 1 : 1250.

Wie bereits erwähnt, läßt die Beobachtungsreihe sehr gut die Entstehung des Pallisadenwachstums erkennen. Weiter ist klar erkennbar, daß in den ersten Entwicklungsstadien an den Stäbchen keine Verzweigungen entstehen. Auch später werden solche in jungen Kulturen nie gebildet. Die Abb. 3 gibt ein späteres Wachstumsstadium einer 4 Tage alten Kultur des gleichen Stammes wieder, die auf neutralem, 3%igem Glycerinagar bei einer Temperatur von 35° C wuchs.



Abb. 3. Einzellkolonie von Stamm 4: 4 Tage alt, Vergrößerung 1 : 1250.

Die Photographie gibt in sehr charakteristischer Weise den Wachstumsmodus des Stammes wieder, der sich bei allen gefalteten Stämmen von *Myc. lacticola* fand. Sie bieten sämtlich in jungen Kolonien das Bild dieser unregelmäßigen Kreise dar. Dieser gleichsam kreisförmige Wachstumsmodus findet sich übrigens auch in der Wiedergabe der Filmaufnahmen der *Kaltblüterbakterien* in der Arbeit von *Wykoff* (Amer. Rev. Tub.). Verzweigungen sind auch dort nicht vorhanden. Erst in 8 Wochen alten Kulturen des Stammes 4 auf 3%igem

Glycerinagar fanden sich, jedoch sehr vereinzelt, an verlängerten und daher nicht mehr voll lebensfähig erscheinenden Stäbchen kurze, laterale Verzweigungen. Die gleichen kurzen Seitenverzweigungen wurden in älteren Kulturen bei Stamm 2 und 3 in synthetischer Nährlösung mit Glykokoll als N-Quelle gefunden. Bei den Stämmen 5 und 6 wurden sie nicht beobachtet. Mit fortschreitendem Alter verkürzen sich bei allen *Lacticola*-Stämmen die Stäbchen, kokkoide Formen sind aber selten.

Die Entwicklung der Kolonien des Stammes 7 verläuft in ganz ähnlicher Weise, nur zeigt dieser Stamm in jungen Kulturen noch ausgesprochener die parallele Anordnung der Stäbchen. Die in Abb. 4 wiedergegebene Kolonie wuchs auf neutralem Hefekochsaftagar bei 35° C, sie ist 3 Tage alt.



Abb. 4.
Einzellkolonie von Stamm 7:
3 Tage alt, Vergrößerung 1 : 1850.

Die anfangs langen und schlanken unverzweigten Stäbchen (0,5 – 0,6 × 2 – 8 μ) werden nach 3 bis 4 Tagen kürzer, die Verkürzung nimmt mit dem Alter zu, doch sind kokkoide Formen auch in alten Kulturen selten. Ein Unterschied zu den Stämmen 2 bis 6 besteht darin, daß der „kreisförmige" Wachstumsmodus bei Stamm 7 weniger ausgeprägt ist. Verzweigungen wurden auch in alten Kulturen auf keinem Nährboden beobachtet.

Das gleiche gilt von *Myc. testudinis*. Dieser Stamm aus der Gruppe der säurefesten *Kaltblüterbazillen* (*Frosch-*, *Fisch-*, *Schildkröten-* und *Schlangenbazillen*) unterscheidet sich von den *Lacticola*-Stämmen durch sein viel langsameres Wachstum, eine Eigenart, die er mit den Warmblüter-Tuberkelbazillen teilt, auch kann seine Kultur derjenigen echter *Tuberkelbazillen* zum Verwechseln ähnlich sehen. Sie gleicht aber auch in hohem Maße den Wachstumsbildern der Stämme 2 bis 7. Unter den hier verwendeten Nährmedien gedieh *Myc. testudinis* in befriedigender Weise nur auf 3%igem Glycerinagar, auf dem auch die Kultur der Abb. 5 wuchs. Aus dieser Abbildung ist ersichtlich, daß die ersten Wachstumsstadien denen der *Lacticola*-Stämme durchaus ähneln, Verzweigungen sind auch hier nicht festzustellen, sie wurden in älteren und alten Kulturen ebenfalls nicht beobachtet. Die



Abb. 5.
Einzellkulturen von *Myc. testudinis*,
Vergrößerung 1 : 1200.

Abnahme des Längenwachstums der Stäbchen findet sich auch hier, kokkoide sind ebenfalls selten.

Der Stamm 14 bildet auf Glycerinagar kurze, in jungen Kulturen immer unverzweigte Stäbchen, die anfangs oft parallele Lagerung zeigen, in älteren Kulturen herrscht Winkelwachstum vor. Auf Dextroseagar sind die Stäbchen länger und schlanker. In seltenen Fällen wurden auf Glycerinnährböden in sehr alten Kulturen kurze, laterale Verzweigungen beobachtet, auf Nährböden anderer Zusammensetzung wurden sie nicht gefunden. In alten Kulturen sind die Stäbchen kürzer, doch kommen kokkoide Zellen kaum vor. *Myc. luteum* zeigt also in Einzellkulturen nicht die geringste Ähnlichkeit mit *Proactinomyceten* und es erscheint durchaus nicht zu rechtfertigen, den Organismus diesen zuzuweisen.


Abb. 6. Einzellkultur von Stamm 8, 9 Stunden alt, Vergrößerung 1 : 1200.

In allen Altersstadien vollständig unverzweigt erwiesen sich stets die Stämme 15 bis 20. Sie bilden sämtlich kurze, feine Stäbchen, die 0,4 — 0,5 × 2 — 5 μ messen, zugespitzt sein können (Stamm 19) und meistens in Winkelstellung auftreten. Vereinzelt kommt daneben aber auch parallele Lagerung vor. Oft bilden sich kleine Ketten von 5 bis 6 Stäbchen, die die Winkellage beibehalten. Die Stämme stellen in jüngeren Kulturen die kleinsten und regelmäßigsten Formen unter allen isolierten dar, nur ganz selten bemerkt man, und zwar in jungen Kulturen, nicht aber in alten, verlängerte und verdickte Individuen, die Ansätze von Verzweigungen aufweisen (Stamm 17), zu einer wirklichen Verzweigung kommt es aber nie. Im Alter bestehen die Kulturen aller Stämme aus Kokken. Aus dem Gesagten geht hervor, daß auch *Myc. eos* keinerlei Merkmale der *Proactinomyceten* aufweist.

Ein ganz anderes Bild bieten dagegen die *Phlei*-Stämme dar (Stämme 8 bis 13). Auf frisches Nährmedium gebracht, streckt sich die kokkoide Ausgangszelle dieser Stämme und es entsteht ein gerades oder gebogenes Stäbchen, das ungleich lang auswachsen kann. Es teilt sich nach wenigen Stunden, und die Tochterzelle stellt sich oft nach einiger Zeit sehr schnell winkelförmig zur Ausgangszelle ein. Bei der weiteren Teilung können die Stäbchen in kleinen Ketten vereinigt bleiben, die die winkelige Lagerung beibehalten, oder auch in gerader Linie hintereinander liegen. Schon in der dritten oder vierten Generation, bereits 7 bis 8 Stunden nach der Impfung, treten seitliche rechtwinkelige Verzweigungen an den Stäbchen auf, wie das die Abb. 6 des Stammes 8 gut erkennen läßt. Die Kolonie wuchs auf neutralem, 1 %igem Dextroseagar bei 35° C. Leider lagen die Stäbchen nicht alle in der gleichen Ebene, was in der Photographie störend wirkt, doch kann über die

Verzweigung kein Zweifel bestehen. Die Verzweigungen wachsen zu ungleich langen Stäbchen oder fadenförmigen Elementen heran, die eine Zeitlang mit den Ausgangsstäbchen verbunden bleiben. Aber schon früh beginnt ein Zerfall der kleinen Kolonie, deren einzelne Glieder sich spontan trennen. Abb. 7 gibt eine 18 Stunden alte Kolonie des Stammes 9 wieder, die während der Beobachtung in sieben Teile auseinanderfiel.

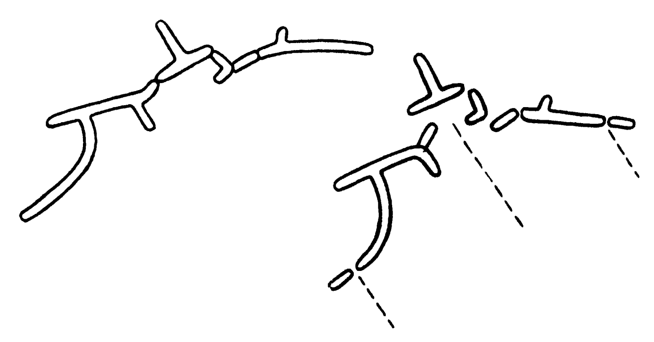


Abb. 7. Einzellkolonie von Stamm 9, 18 Stunden alt.

Auf diese Weise verkürzen sich Stäbchen und Verzweigungen. In späteren Wachstumsstadien erreichen die lezteren außerdem nie mehr die Länge der zuerst gewachsenen, 2 Tage nach der Impfung waren sie kürzer und seltener geworden, und nach weiteren 24 Stunden waren sie ganz verschwunden. Die Kolonie bestand dann aus unverzweigten, plumpen, kurzen Stäbchen, die meist Winkellagerung aufwiesen und zuweilen die charakteristisch gewinkelten kurzen Ketten bildeten. Abb. 8 zeigt das Bild des Stammes 27 nach dreitägigem Wachstum auf 1 %igem Dextroseagar, sie ist typisch für alle untersuchten *Phlei*-Stämme dieses Alters. Am nächsten Tage finden sich viele kokkoide Formen, die in alten Kulturen fast ausnahmslos vorhanden sind. Wird eine von ihnen auf neues Nährsubstrat übertragen, so beginnt der Zyklus von neuem.



Abb. 8. Kultur von Stamm 27, 3 Tage alt, Vergrößerung 1 : 300.

Durch den geschilderten Wachstumsverlauf erweisen sich die *Phlei*-Stämme ungezwungen als Verbindungsglieder zu den *Proactinomyceten*, denen sie in ihrem Wachstumszyklus durch Anfangsverzweigung und Koloniezerfall geradezu entgegenkommen. Aus der frühzeitigen

Ausbildung der Verzweigungen und ihrem schnellen Zerfall, sowie aus der geringeren Entwicklung und Häufigkeit der Verzweigungen beim Fortschreiten des Wachstums erklärt sich wahrscheinlich die Beobachtung von *Jensen*, nach der *Myc. phlei* „selten verzweigt“ sein soll.

Der Stamm 27 bedarf einer besonderen Erwähnung. Er wurde als atypische Form keiner der bekannten Arten zugewiesen. Seine Kulturen sind auf Dextroseagar fleischfarben, auf Glycerinagar gelb bis schwach rötlich, wachsartig, mattglänzend, in älteren Kulturen kommt es zu leichter Faltung. Auf Asparaginagar nach *Jensen* findet schwaches, farbloses Wachstum statt, Gelatine wird nicht verflüssigt, Milch nicht koaguliert und nicht peptonisiert. Aus kokkoiden Zellelementen gehen auf frischem Nährmedium Stäbchen hervor, die in Einzellkultur 8 bis 9 Stunden nach der Impfung auf Dextroseagar bei 35° C kurze Verzweigungen aufwiesen. Diese sind nach wenigen Tagen nicht mehr vorhanden, die Abb. 8 gibt, wie erwähnt, das Bild einer 3 Tage alten Kultur des Stammes wieder. Sie zeigt die charakteristischen Winkelformen und kurzen Ketten, wie sie in den Kulturen der *Phlei*-Stämme gleichen Alters auftreten. Später werden die Stäbchen kokkoid. Bewegliche Formen treten nicht auf, alle Kulturlösungen bleiben klar. Der Stamm überlebt das Erhitzen auf 60° C während 1 Stunde und wächst bei 47° C, Arabinose wird als Kohlenstoffquelle ausgenutzt. Somit könnte Stamm 27 seinen morphologischen und biologischen Eigenschaften nach ein *Phlei*-Stamm sein, aber seine Säurefestigkeit ist auf allen Nährböden und zu allen Altersstadien gering. Nach sechstägiger Kultur in Milch, die die Säurefestigkeit erhöht, finden sich innerhalb der Stäbchen säurefeste Strukturen. Meistens liegen drei bis vier, seltener bis zu sechs runde Körperchen in den Stäbchen, die der Entfärbung in 5 %iger Schwefelsäure während 1 Minute wiederstehen, die Stäbchen als Ganzes sind aber auch in den Milchkulturen nicht säurefest.

Verschiedene Autoren (*Vierling*, *Gray* und *Thornton*, *Eichbaum*) berichteten über nicht oder inkonstant säurefeste, ihrer Morphologie und Physiologie nach aber zu den *Mycobakterien* gehörende Organismen, die namentlich der *Phlei*-Gruppe nahestanden, so daß ihre systematische Einordnung in ein anderes Genus nicht gerechtfertigt erschien. Daher ist es fraglich, welche Bedeutung der im übrigen recht labilen Eigenschaft der Säurefestigkeit zuzusprechen ist. Die amerikanischen Forscher verwenden sie heute nicht mehr als Einteilungsgrund, da sie in unseren immerhin unnatürlichen Kulturbedingungen bei dem einen Stamm ausgesprochener hervortreten könnte als bei dem anderen. Immerhin wollte es mir nicht zulässig erscheinen, Stamm 27 ohne weiteres bei den *Phlei*-Stämmen einzureihen.

Die Stämme 21 bis 26 stellen, wie bereits erwähnt, Übergangsformen dar, die zwischen *Actinomyceten* und *Mycobakterien* stehen,

und heute wohl allgemein als *Proactinomyceten* bezeichnet werden. Über den Wandel in ihrer Bezeichnung und systematischen Einreihung wurde auf S. 96 berichtet. *Jensen* stellte 1932 die Familie der *Proactinomyceten* auf, *Krassilnikow* veröffentlichte 1938 vergleichende Studien mit verschiedenen *Proactinomyces*-Arten (englische Zusammenfassung). In alten Kulturen finden sich fast nur kokkoide Formen, die auf frischem Medium zu Stäbchen auskeimen. Abb. 9 gibt eine Einzellkultur von Stamm 21, der als Typus gelten kann, nach 15stündigem Wachstum auf Dextroseagar bei 35° C wieder.



Abb. 9. Einzellkultur von Stamm 21, Vergrößerung 1 : 420.

Abb. 10 zeigt den gleichen Stamm 25 Stunden nach der Impfung. An den Stäbchen sind rechtwinklige Verzweigungen deutlich erkennbar, die kleine Kolonie ist umgeben von einer Flüssigkeitszone, die sich in der Photographie unverkennbar abhebt. Nach weiteren 15 Stunden hat sich ein kleines, zusammenhängendes, verzweigtes Mycel gebildet, dessen Hyphen Neigung zeigen in den Agar hineinzuwachsen, die sich aber auch als winzige Lufthyphen über die Agaroberfläche erheben. In Abb. 11 ist bereits erkennbar, wie sich von einem solchen Mycel winklig gelagerte Teilstückchen abtrennen. Dieser Vorgang setzt sich bei fortschreitendem Wachstum fort, die Teilstücke zerfallen weiter, und nach etwa 6 Tagen besteht die



Abb. 10. Einzellkultur von Stamm 21, Vergrößerung 1 : 420.



Abb. 11. Einzellkultur von Stamm 21, Vergrößerung 1 : 420.

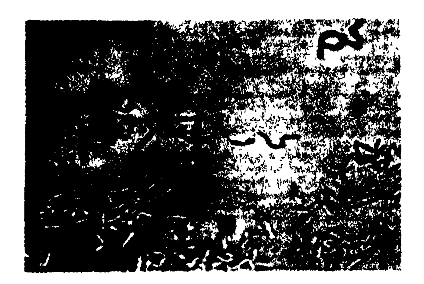


Abb. 12. Einzellkultur von Stamm 21, Vergrößerung 1 : 420.

Kultur nur aus unverzweigten, meist kurzen, ausschließlich winklig gelagerten Stäbchen, die sich noch weiter durch Teilung vermehren. Abb. 12 zeigt ein solches Wachstumsstadium. Wenn noch hier und da an den Stäbchen eine Verzweigung auftritt, so ist sie stets kurz und unbedeutend.

Das ursprünglich myceliale Wachstum geht also über in die Zellteilung nach dem „snapping“ Typ *Jensens*. Nach etwa 8 Tagen war

in Einzellkulturen keine Vermehrung der Stäbchen mehr zu beobachten, der Zerfall der Stäbchen in kokkoide Formen ging aber weiter, so daß in alten Kulturen stets fast ausschließlich kokkenartige Organismen vorhanden sind. Wird einer von ihnen auf frisches Substrat gebracht, so setzt der beschriebene Zyklus von neuem ein. *Actinomyces*-ähnliche Sporen, wie *Krassilnikow* sie bei einem Stamm fand, wurden nie gebildet.

Im mikroskopischen Bild (Abb. 8) wurde beobachtet, daß das jugendliche Mycel in einer Flüssigkeitsumgebung geradezu eingebettet ist, so daß die sich ablösenden Teilstückchen förmlich davonschwimmen. Auf welche Weise sich der Organismus diese Flüssigkeitsumgebung schafft, konnte im einzelnen nicht ermittelt werden, doch wurden Versuche angestellt, um ihre Zusammensetzung auf das Vorhandensein von Schleimstoffen zu prüfen. Nach dreistündiger Einwirkung einer mäßig konzentrierten alkoholischen Metyhlviolettlösung konnte festgestellt werden, daß eine die einzelnen Individuen gleichmäßig umgebende Schleimschicht nicht vorhanden ist (Methode von *A. Meyer*, zitiert nach *Schneider-Zimmermann*, S. 400). Es waren oft schwach violett gefärbte Fäden mit unregelmäßig gelagerten, dunkler gefärbten Inhaltskörpern zu erkennen, die sich von einem Bakterium zum anderen zogen. In gleicher Weise gefärbte Schleimfäden umgaben auch zusammenliegende Bakterienhäufchen, so daß diese vollständig in ihnen eingebettet waren. Um die Organismen herum ließen sich also schleimartige Umsetzungsprodukte nachweisen, die möglicherweise gemeinsam mit aus dem Agar herausgezogenem wässerigem Substrat und in Verbindung mit dem aus der Atmung der Bakterien stammenden Wasser die Flüssigkeitsumgebung schaffen, die der Verbreitung der abgestoßenen Mycelteile so förderlich ist.

Wykoff hat in Beobachtungen am Film festgestellt, daß in einer jungen Kultur anfangs das Wachstum die Teilung übertrifft, „daß aber die Teilung lange fortdauert, nachdem die Zeit des schnellen Wachstums vorbei ist". Die letztere Beobachtung deckt sich mit der oben erwähnten, daß nämlich in Einzellkulturen von Stamm 21 eine Vermehrung der Stäbchen nicht mehr beobachtet wurde, der Zerfall in kokkoide Formen aber anhielt. Diese Diskrepanz zwischen Teilungsintervall und Wachstumsenergie ist sehr interessant. Sie ist geeignet, wenigstens zum Teil die Vielgestaltigkeit der Formen bei den *Mycobakterien* zu erklären. Bei gleichbleibendem Teilungsintervall müssen bei großer Wachstumsenergie, wie sie beim Beginn einer neuen Kolonie stets vorhanden ist, längere Formen, also Stäbchen, entstehen, während bei verminderter Wachstumsenergie in einer älteren Kolonie diese Stäbchen immer kürzer werden müssen, um schließlich, sobald die Wachstumsenergie nahezu ganz aufhört, Kokkenform anzunehmen. Dabei bleibt natürlich ganz ungeklärt, aus welchem Grunde mit der ermattenden Wachstumsenergie nicht auch die Verlängerung des Teilungsintervalls einhergeht.

Untersuchungen zur Bildung von Sporen und anderen Dauerformen.

Ein ebenso umstrittenes Gebiet wie die Verzweigung ist das der Bildung von umweltresistenten Dauerformen.

Endosporen wie bei Bakterien oder Sporen nach Art der *Actinomyceten* wurden bei den *Mycobakterien* allerdings niemals beschrieben, sie traten bei den hier besprochenen Stämmen ebenfalls nie auf, obgleich eine große Zahl von Überimpfungen auf Agar mit verschiedenen Zusätzen vorgenommen wurde, von denen angenommen werden konnte, daß sie eine Sporenbildung fördern würden. Hierzu erwiesen sich oft sehr nährstoffarme Nährböden als gut brauchbar.

Vertreter der einzelnen Arten wurden daher geimpft auf Medien, in denen z. B. gewöhnliche Nährbouillon auf die Hälfte, sowie auf $^1/_4$, $^1/_{10}$ und $^1/_{20}$ ihrer normalen Konzentration verdünnt war. Weiter wurde geimpft auf Würzenährböden in der Verdünnung auf $^1/_{10}$ und $^1/_{20}$, zu denen teilweise 0,5 bzw. 0,1% Pepton zugesetzt war. Auch ein Kartoffelagar[1] in Verdünnungen von $^1/_2$, $^1/_4$ und $^1/_{10}$ kam zur Verwendung, ebenso Chapec-Agar. Ferner wurden auch flüssige Nährböden, z. B. Peptonwasser in verschiedenen Verdünnungen beimpft, sowie synthetische Nährlösungen mit verschiedenen Stickstoffquellen und in verschiedenen Konzentrationen. Auch auf Gipsplatten wurde das Material der verschiedenen Arten geimpft.

Im allgemeinen ist über die Entwicklung auf diesen Medien zu sagen, daß die *Mycobakterien* schlecht wuchsen auf stickstoffarmem aber kohlenstoffreichem Substrat, wie z. B. dem Kartoffelnährboden, ihr Wachstum aber besser war auf stickstoffreichem aber kohlenstoffarmem Medium wie Bouillon und Pepton. Alle Stämme wuchsen noch gut bei $^1/_4$% Dextrosegehalt, wenn der Gehalt an Stickstoff im Substrat genügend war, sie entwickelten sich aber schlecht auf unverdünntem Kartoffelsaft, der nur etwa 0,07% N enthält (*Stapp* und *Bortels*). Ein Zusatz von Stickstoff erhöht auf ihm das Wachstum, ein Zusatz von Dextrose bleibt ohne Einfluß. Schwaches Wachstum aller Stämme fand noch statt bei Verdünnung von gewöhnlicher Nährbouillon auf $^1/_{20}$ ihrer normalen Konzentration. Auf unverdünntem Würzeagar fand nie eine Entwicklung statt, auf seinen Verdünnungen erfolgte mehr oder weniger gutes Wachstum, wenn Pepton zugesetzt war.

Auf keinem dieser Nährböden wurden Endosporen wie bei *Bakterien* oder Luftsporen wie bei *Actinomyceten* gebildet.

Bei Stamm 4 gelang es aber, umweltresistente Dauerformen anderer Art festzustellen. Von einer 10 Tage alten Kultur dieses Stammes auf 3%igem Glycerinagar wurde am 30. April 1941 überimpft auf ein Schrägagarröhrchen mit Bouillon-Nährboden, der auf $^1/_{10}$ seiner normalen Konzentration verdünnt war. Das Agar war bereits am 25. Januar 1941

[1] 400 bis 600 g geschälte, feingeschnittene Kartoffeln kochen, filtrieren. Das Filtrat auffüllen auf 1000 ccm.

hergestellt und in das Röhrchen eingefüllt worden. Es war mit Wattestopfen verschlossen. Die Kultur wurde während 8 Wochen bei 35° C gehalten, später stand sie bei Zimmertemperatur. 8 Wochen nach der Impfung fanden sich in der Kultur vorwiegend am oberen Rande des Nährbodens kleine, staubfeine Anhäufungen, die im auffallenden Licht weiß, im durchfallenden dunkel aussahen. Sie bestanden aus winzigen kugelförmigen Elementen von 0,2 bis 0,4 μ Durchmesser, die bei tiefer Tubuseinstellung dunkel erschienen, bei hoher aufleuchteten. Außer diesen freiliegenden Granula — wie sie, gemäß der sich mehr und mehr einbürgernden Bezeichnung auch hier genannt seien — fanden sich in den Anhäufungen auch Stäbchen von 1,4 bis 1,6 μ Länge und 0,4 bis 0,5 μ Breite, in denen häufig dunkler erscheinende kreisrunde körnige Strukturen feststellbar waren. Zuweilen lagen diese Einschlüsse an einem Ende des Stäbchens oder an seinen beiden Polen, es fanden sich aber auch Stäbchen, die ein bis drei mittelständige Körnchen enthielten und deren Mitte dann immer etwas aufgetrieben war. Bei Färbung mit Eisenhämatoxylin und Fuchsin ist das Stäbchen, auch wenn es in lebenden Präparaten nicht mehr erkennbar ist, als Hülle um die Granula liegend lange mehr oder weniger deutlich nachweisbar. *Krassilnikow* (1934) beschreibt ebenfalls von einigen seiner isolierten Stämme diese Innenstrukturen.


Abb. 13. Stamm 2. Milchkultur: 4 Wochen alt, Vergrößerung 1 : 1850.

Ganz ähnliche Bilder wurden in 4 Wochen alten Milchkulturen von Stamm 2, 4 und 5 beobachtet. Die Abb. 13 läßt deutlich ein Stäbchen erkennen, in dem sich vier Granula befinden. Das Stäbchen selbst ist anscheinend bereits weitgehend verändert, sei es durch autolytische oder exogene Fermente, das erste Granulum ist schon freigeworden und aus dem Stäbchen ausgetreten; es liegt nicht mehr in der gleichen Ebene mit den anderen und erscheint daher in der Photographie unschärfer. Die drei anderen füllen die Breite des Stäbchens vollständig aus, sie sind voll entwickelt. Das Präparat wurde mit *Ziehl*schem Carbolfuchsin gefärbt und darauf 1 Minute mit 5%iger Schwefelsäure behandelt. Färberisch verhalten sich die Granula wie die intakten Stäbchen: sie sind streng säurefest. Im Gram-Präparat erscheinen sie tief blauschwarz, mit Methylgrünessigsäure (Färbezeit 12 Stunden) dunkel-grünblau, bei Behandlung nach *Feulgen* blauviolett. Die Färbung nach *Giemsa* läßt die Granula dunkel-blaurot, die Konturen der Stäbchen schwach bläulich erscheinen. Oft konnten Granula auch frei in der Milch liegend nachgewiesen werden.

Aus den Granula-Häufchen der soeben beschriebenen Kultur auf verdünntem Bouillon-Agar wurde am 18. November 1941, also 6 1/2 Monate nach der Beimpfung des Nährbodens, eine kleine Öse Material in 1 ccm

sterilem destilliertem Wasser aufgeschwemmt und aus der Aufschwemmung auf einen *Fortner*schen Deckglasagarblock geimpft (3%iges Glycerinagar). Nach 24stündiger Bebrütung bei 35° C bot sich das Bild, das die Abb. 14 wiedergibt. Es zeigt die Granula zum Teil in ihrer ursprünglichen Form, aber um etwa das Doppelte aufgequollen. Andere haben sich nach einer Richtung hin verlängert und sind zu winzigen Stäbchen ausgewachsen. 24 Stunden später haben diese Stäbchen sich verbreitert und gestreckt und an den Polen sind deutlich Zonen ver-

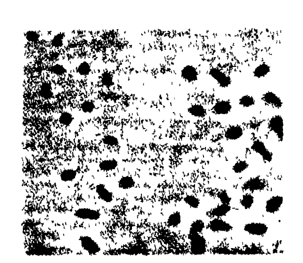


Abb. 14. Granulakeimung, Stamm 4, 24 Stunden alt, Vergrößerung 1 : 1250.

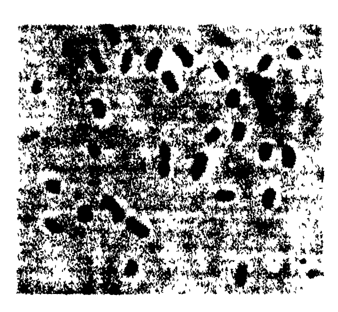


Abb. 15. Granulakeimung, Stamm 4, 48 Stunden alt, Vergrößerung 1 : 1250.

dichteten Plasmas entstanden. Mit diesem Entwicklungsstand hörte in diesem Falle das Wachstum auf (Abb. 15). Auf einer zweiten Deckglaskultur waren aber aus dem gleichen Material 5 Tage nach der Impfung kleine Kolonien entstanden, die ganz das typische Bild des Wachstumsbeginns dieses Stammes aus vegetativem Impfmaterial darbieten, was beim Vergleich mit der Abb. 3 sehr deutlich wird (Abb. 16). Von dieser Deckglaskultur wurde auf Schrägagarröhrchen abgeimpft, es wuchsen normale Kulturen des Stammes 4.

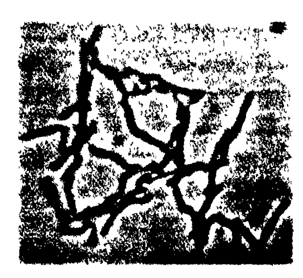


Abb. 16. Granulakeimung, Stamm 4, 5 Tage alt, Vergrößerung 1 : 1250.

Wir haben also in dem Ganulum ein Dauerstadium des Bakteriums zu sehen, das die Fähigkeit besitzt, über langandauernde Perioden ungünstiger Umweltsbedingungen hinaus die Art zu erhalten. Die vegetativen Formen, nach denen die Einordnung des Mycobakteriums im System vorgenommen wird, sind nur eine Entwicklungsstufe wie bei einem komplexen Organismus. Dieses Dauerstadium kommt höchstwahrscheinlich vorwiegend zur Ausbildung in Verhältnissen, die ungünstige Ernährungsbedingungen für die vegetativen Formen bieten, in unserem Falle auf dem sehr stark verdünnten, schon etwas eingetrockneten

Bouillonagar und in der jedenfalls wenig assimilierbaren Milch. Weitere Untersuchungen nach dieser Richtung wären sehr zu begrüßen und könnten im Hinblick auf die nahe Verwandtschaft von *Myc. lacticola* zum humanen *Tuberkelbazillus* von größter Bedeutung sein.

Von verschiedenen Forschern wurden an *Tuberkelbazillus*-Kulturen, Typus humanus, bereits Beobachtungen gemacht, die dem oben mitgeteilten Befund durchaus analog sind. *Myc. tuberculosis* vermehrt sich gewöhnlich durch Querteilung. Unter gewissen Umständen finden sich aber in den Zellen körnige Strukturen, die bereits von *Robert Koch* als Sporen gedeutet wurden, deren Auskeimung von ihm aber nicht beobachtet wurde. Später beschrieb *Spengler* „aus dem Kettenverband herausgetretene Körner", die er als Splitter bezeichnete, denen er aber keine Sporenqualitäten zubilligen wollte. Beträchtliches Aufsehen erregten die Untersuchungen von *Much*, der humane Tuberkelbazillen in Milch impfte, in der nach einiger Zeit feine Körnchen entstanden, „die anfangs auch nach *Ziehl*, später nur nach *Gram* färbbar waren". In gesundes Gewebe verschleppt, sollen sie sich zu säurefesten Stäbchen entwickeln können. In zwei Arbeiten berichtete ferner *Morten Kahn* über Ergebnisse an Beobachtungen des Initialwachstums einzelner Tuberkelbazillen im hängenden Tropfen. Er kommt zu der Auffassung, daß „reife" Tuberkelbazillen sich in immer kleinere Kleinkokken teilen, die schließlich ein kleines kolonieähnliches Konglomerat bilden. Aus den Kleinkokken sprossen stäbchenförmige Elemente, die schließlich zu den „reifen" Stäbchen des Tuberkelbazillus heranwachsen, „der Ring ist geschlossen", wie er wörtlich sagt. *Kahn* stellte bei 240 Kulturen in zwei Fällen den beschriebenen Entwicklungsgang fest. *Fontés* hält ebenfalls das Granulum für die Dauerform des Tuberkelbazillus, *Eduard Gróh* kommt bei Untersuchungen an humanen und bovinen Tuberkelbazillen zu ähnlichen Ergebnissen, *Lominski* berichtet, daß er bei säurefesten Granula von *Myc. tuberculosis* Auskeimung beobachtet habe. Endlich sei noch die Arbeit von *Hu* erwähnt, der ebenfalls die Auskeimung eines freien Granulums beobachtete.

Über die Benennung dieser „Dauerform", wie man sie wohl nach meinen Beobachtungen bezeichnen kann, herrscht noch keine Einheitlichkeit. *Spengler* nennt sie „Splitter", *Much* bezeichnet sie als „Granulum", *Kuhn* als „C-Form", *Pla y Armengol* als „Angriffsform". Es hat sich bisher die Bezeichnung „Granulum" eingebürgert, sie wird auch in einer kürzlich erschienenen Arbeit von *Lembke* und *Ruska* angewandt. *Lembke* und *Ruska* veröffentlichten Untersuchungen an verschiedenen *Tuberkelbazillen*-Arten im Übermikroskop. Bei Vergrößerungen von 1 : 10000 sahen sie ebenfalls große und kleine Granula und beschreiben ihre Entstehung. Zur Keimungsfähigkeit dieser Elemente bemerken sie, daß diese „bisher nur von wenigen Forschern beobachtet worden sei und nicht als sicher bewiesen gelten könne." Die bei den vorliegenden Untersuchungen gewonnenen Ergebnisse schließen sich denen der „wenigen Forscher" an und ich hoffe, der Klärung dieses Problems gedient zu haben dadurch, daß es mir gelungen ist, auch von der Seite der nahe verwandten Boden-*Mycobakterien*

her eine Stütze für die Stichhaltigkeit der Beobachtungen dieser Wenigen erbracht zu haben. Doch erscheint mir der Ausdruck „Granulum“, eine für die heterogensten Dinge angewandte Bezeichnung, nicht ganz glücklich. Es bedarf noch weiterer Untersuchungen, mit welcher bei anderen Organismen vorkommenden Sporenform man die fraglichen Gebilde gleichsetzen kann, bzw. ob das überhaupt möglich ist.

Die Säurefestigkeit.

Ein für alle Stadien und Umweltsbedingungen zutreffendes Urteil über die Entfärbungsresistenz der *Mycobakterien* des Bodens läßt sich nicht abgeben, es ist nicht einmal möglich für eine einzige Art. Die Säurefestigkeit ist vielmehr nach unseren heutigen Kenntnissen eine sehr labile Eigenschaft aller „säurefesten“ Organismen, insbesondere der Saprophyten. Sie ist abhängig von einer großen Zahl äußerer Bedingungen und Voraussetzungen.

Zunächst ist die Methode, mit der sie festgestellt wird, von Wichtigkeit. Die Ergebnisse sind verschieden, ob die Färbung durch Erhitzen oder durch verschieden langes Behandeln der Präparate in der Kälte durchgeführt wird, sie sind andere bei verschieden langer Dauer der Säureeinwirkung und unterschiedlichem Dissoziationsgrad der Säure, sie weichen voneinander ab, je nachdem eine Nachfärbung vorgenommen wird oder nicht. Wahrscheinlich gehen auf diese „Labilität“ der Reaktion in vielen Fällen die abweichenden Angaben verschiedener Autoren bei den gleichen Organismen zurück. So beschreibt z. B. *Grassberger* seinen Organismus als nicht säurefest, während *Hefferan* ihm eine „sehr gute“ Säurefestigkeit zuspricht. Es wäre daher sehr begrüßenswert, wenn durch Übereinkunft eine einheitliche Handhabung der Säurefestigkeitsprüfung, die von allen Untersuchern einzuhalten wäre, festgelegt würde in der Art, wie ähnliche Standardisierungen von amerikanischen Forschern bereits durchgesetzt sind. Jedenfalls würde diese Maßnahme eine Reihe von Einzelangaben in den Spezialarbeiten überflüssig machen.

In den vorliegenden Untersuchungen wurde das Carbolfuchsin kalt auf den Objektträger gegossen und auf ihm mehrere Male bis zur Blasenbildung erhitzt. Die Entfärbung erfolgte durch n Schwefelsäure, n Essigsäure, n/110 Schwefelsäure und 70 %igen Alkohol mit Zusatz von 1 % HCl. Die Entfärbungszeit betrug stets 1 Minute. Eine Nachfärbung wurde nicht gemacht. Stärkere Säuren, wie sie einige Autoren benutzten, wurden nicht verwendet, weil ihre Einwirkung die morphologischen Strukturen der Bakterien zu sehr veränderte.

Aber nicht nur durch die Färbemethode kann das Ergebnis bei der Säurefestigkeitsprüfung beeinflußt werden. Von großer Bedeutung ist auch das Alter der Kulturen, wozu die Tabelle IV einen Überblick gibt.

Die Kulturen der Tabelle IV wuchsen in Nährbouillon mit Zusatz von 1 % Dextrose bei 35° C, das p_H betrug 6,4, die Entfärbung wurde mit 5 %iger Schwefelsäure vorgenommen, Entfärbungszeit 1 Minute.

Tabelle IV. Einfluß des Alters auf die Säurefestigkeit.

Stamm	Alter der Kultur	Säurefestigkeit	Stamm	Alter der Kultur	Säurefestigkeit
2	3 Tage	++[1]	11	3 Tage	+
	4 Wochen	++		4 Wochen	etwa 90 % der Stäbchen enfärbt
3	3 Tage	++	14	3 Tage	etwa 40 % der Stäbchen entfärbt
	4 Wochen	++		4 Wochen	wenige Stäbchen als Ganzes säurefest
4	3 Tage	++	15	3 Tage	±[3]
	4 Wochen	+[2]		4 Wochen	wenige Stäbchen als Ganzes säurefest
6	3 Tage	+	21	3 Tage	wenige Stäbchen säurefest
	4 Wochen	ein Teil der Stäbchen entfärbt		4 Wochen	nicht säurefest
8	3 Tage	wenige Stäbchen entfärbt			
	4 Wochen	viele Stäbchen entfärbt			
9	3 Tage	+			
	4 Wochen	viele Stäbchen entfärbt			

[1] ++ = streng säurefest. — [2] + = einige Stäbchen entfärbt. — [3] ± = mehr als die Hälfte der Stäbchen entfärbt.

Die in der Tabelle aufgeführten Stämme sind sämtlich nach 3 Tagen bei der angegebenen Kulturtemperatur gut entwickelt, die Säurefestigkeit ist bei fast allen zu diesem Zeitpunkt größer als nach 4 Wochen Kulturdauer. In ganz jungen Kulturen ist die Säureresistenz bei den meisten verhältnismäßig schwach, in ganz alten erleidet sie oft eine noch größere Einbuße als die Tabelle ausweist. Die Säurefestigkeit von Stamm 14 ist immer gering, ebenso sind alle *Proactinomyceten* immer nur wenig säureresistent.

Sehr deutlich tritt in der Tabelle V die Bedeutung der Zusammensetzung des Nährbodens für den Ausfall der Entfärbungsresistenz in die Erscheinung.

Tabelle V. Einfluß des Nährbodens auf die Säurefestigkeit.
Alter der Kulturen 14 Tage. Nährboden-p_H = 7. Temperatur 35° C.

Stamm	Nähragar mit 2 % Dextrose	Nähragar mit 2 % Glycerin	Hefekochsaftagar	Synthetisches Agar mit $NaNO_3$
4	+[1]	++[2]	±[3]	±
6	+	++	±	±
8	+	+	±	±
14	–[4]	±	—	—
16	±	+	±	—
21	±	in einigen Stäbchen säurefeste Inhaltskörper	–	—

[1] + = einige Stäbchen entfärbt. — [2] ++ = streng säurefest. — [3] ± = mehr als die Hälfte der Stäbchen entfärbt. — [4] — = nichts, fest.

Die Tabelle läßt erkennen, daß auf dem Glycerinnährboden die Säurefestigkeit am besten, auf dem synthetischen Agar mit $NaNO_3$ als Stickstoffquelle am geringsten ausgebildet war, der Dextroseagar und der Hefekochsaftnährboden stehen dem Glycerinagar etwas nach. Es kann also der Grad der Säurefestigkeit durch das Nährsubstrat gesteigert bzw. verringert werden. Ältere Autoren (*Bienstock*, *Gottstein*) gingen so weit, zu behaupten, daß nicht säurefeste Organismen säureresistent gemacht werden könnten durch Kultivieren auf fett- und wachsreichen Medien oder sogar durch Zerreiben in einem fetthaltigen Substrat. Sie fanden aber bald Widerspruch. *Rabinowitsch* z. B. zeigte, daß durch fetthaltiges Medium niemals Säurefestigkeit hervorgerufen, sondern nur bereits bestehende erhöht werden kann. Auf den teilweisen bzw. vollständigen Verlust der Säureresistenz auf proteinfreien und glycerinfreien Medien wies schon *B. Lange* hin, den Einfluß erhöhter H-Ionenkonzentration im Nährboden nach der gleichen Richtung betonte in neuerer Zeit *Kirchne*.

Andere Forscher (*Frei* und *Pockschischewsky*) haben angegeben, daß die *Art* der verwendeten Säure für den Ausfall der Reaktion von Bedeutung sei. Hierzu wurden nähere Untersuchungen angestellt. Es wurden eine Reihe von Stämmen, bei denen gleiche Voraussetzungen vorlagen (Alter, Art und Reaktion des Nährbodens, Kulturtemperatur u. dgl.), auf ihre Entfärbungsresistenz geprüft gegenüber der Einwirkung von n Schwefelsäure und n Essigsäure. Bei den streng säurefesten *Lacticola*-Stämmen war ein Unterschied in der Einwirkung beider Säuren nicht erkennbar, allerdings erschienen die Granula immer dunkler rot, also weniger entfärbt, nach Behandlung mit n Essigsäure. Bei den *Phlei*-Stämmen schienen aber nach Einwirkung der n Essigsäure stets mehr Bakterien der Entfärbung widerstanden zu haben als nach Behandlung mit n Schwefelsäure. Dieser Unterschied verstärkte sich bei den gegen Schwefelsäure wenig resistenten Formen und wurde bei den *Proactinomyceten* sehr auffällig. Es wurde also der Eindruck erweckt, als ob mit der Empfindlichkeit gegenüber der Einwirkung normaler Schwefelsäure eine relative Widerstandsfähigkeit gegen die der normalen Essigsäure einherginge. Die Schlußfolgerung, dem Anion beider Säuren eine Bedeutung bei diesem Ergebnis zuzumessen, lag nahe, vielleicht konnte auch das Molekül der Säuren als Ganzes für das ungleiche Ergebnis verantwortlich sein. Zur Klarstellung dieser Frage wurde mit Hilfe der *Sörensen*schen Farbindikatoren eine Schwefelsäurelösung hergestellt, die die gleiche H-Ionenkonzentration besaß wie die n Essigsäure. Es ist dies eine Lösung, die etwa n/110 ist, beide Säuren besitzen dann ein p_H von ungefähr 2,5. Bei der Anwendung dieser beiden Säuren waren die Entfärbungsintensitäten stets ganz gleich, wie die Tabelle VI erkennen läßt.

Es ergibt sich aus diesen Versuchen, daß die Säureresistenz der Boden-*Mycobakterien* nicht bedingt wird von der *Art* der einwirkenden Säure, sondern lediglich von ihrer H-Ionenkonzentration. Es ist sehr

Tabelle VI. Einfluß des Dissoziationsgrades der Säuren auf die Säurefestigkeit.

Alter der Kulturen 14 Tage. Nähragar mit 3% Glycerin, p_H 7.

Stamm	Entfärbung mit n-Schwefelsäure	Entfärbung mit n-Essigsäure	Entfärbung mit n/110 Schwefelsäure
14	wenige Stäbchen als Ganzes säurefest	viele Stäbchen als Ganzes säurefest	wie in Essigsäure
21	wenige Stäbchen mit säurefesten Inhaltskörpern	dasselbe	„ „ „
22	dasselbe	dasselbe	„ „ „
23	einige Stäbchen mit säurefesten Inhaltskörpern	viele Stäbchen säurefest	„ „ „
24	dasselbe	dasselbe	„ „ „
27	in einigen Stäbchen säurefeste Inhaltskörper	viele Stäbchen als Ganzes säurefest	„ „ „

wahrscheinlich, daß dieses Gesetz für alle Säuren gilt und daß alle säurefesten Bakterien ihm unterstehen.

Zur Entfärbung mit 70%igem Alkohol + 1% HCl braucht nur kurz angegeben zu werden, daß ausschließlich die *Lacticola*-Stämme eine deutliche Entfärbungsresistenz gegen dieses Mittel besaßen. Bei den *Phlei*-Stämmen war nach einer Einwirkungszeit von 1 Minute nur in einer kleinen Zahl von Stäbchen die Färbung erhalten, die Vertreter der übrigen Arten waren entfärbt.

Über die Ursache der Säurefestigkeit ist viel diskutiert worden. Schon früh brachte man den Fett- und Wachsgehalt der säurefesten Bakterien in Beziehung zur Säureresistenz. *Hammerschlag* wies als erster in quantitativen Untersuchungen bei dem humanen *Tuberkelbazillus* besonders reichliche Substanzen nach, die in den gewöhnlichen Fettlösungsmitteln löslich waren. Seine Befunde wurden von vielen Autoren bestätigt (*Klebs*, *Kresling*, *Bauderan* u. a.). Diese Lipoidsubstanzen stellten sich die Forscher ganz allgemein als eine Hülle um den Bakterienleib herumliegend vor. Die älteren Autoren führten daher das färberische Verhalten der Säurefesten ausschließlich zurück auf das Vorhandensein einer Fett- und Wachshülle (*Marmorek*, *Bulloch*, *Mc. Leod*, *Tamura*).

Die experimentellen Befunde späterer Untersuchungen (*Pfannenstiel*, *Long*) widersprachen aber dieser Vorstellung, denn die Menge der durch fettlösende Mittel dem Bakterienleib entzogenen Substanz geht nicht parallel dem Verlust der Säurefestigkeit des Bakterienrückstandes. Es ist vielmehr niemals gelungen, durch bloßes Behandeln mit lipoidlöslichen Mitteln die Säureresistenz bei den behandelten Organismen zu beseitigen. Diese Tatsache fand sich auch bei den vorliegenden Untersuchungen immer wieder. Durch diese Erfahrungen wurde die Vorstellung unhaltbar, daß lediglich in einer Lipoidhülle die Ursache der Säurebeständigkeit zu sehen sei.

Gegenwärtig besteht wohl allgemein die Auffassung, daß physikalische oder physikalisch-chemische Eigenschaften, wie Struktur und Dichtigkeit

des Plasmas das ausschlaggebende Moment für die mehr oder weniger große Säureresistenz darstellen (*Schloßberger*, *Sordelli* und *Arena*). Beim Zustandekommen dieser Dispersitätsunterschiede der Plasmakolloide gegenüber den nicht säurefesten Organismen dürften die Lipoidsubstanzen aber wesentlich beteiligt sein.

Über Quantität und Zusammensetzung der Lipoidsubstanzen liegen seit längerer Zeit für den *Tuberkelbazillus* zahlreiche Untersuchungen vor. Die Versuchsergebnisse gehen weit auseinander, so daß z. B. die Angaben über die Menge der extrahierten Lipoide zwischen 8 und 44% des Trockengewichts schwanken (*Ruppel* fand 8 bis 26%, *Baudran* 36 bis 44%). Erst beträchtlich später wurden auch Boden-*Mycobakterien* in den Kreis der Untersuchungen einbezogen. Auch bei ihnen wechselt die Menge der von den einzelnen Autoren extrahierten Substanzen. Diese Unterschiede beruhen in erster Linie auf der Verschiedenheit der Methodik und der Extraktionsmittel. *Pfannenstiel*, der neben Warm- und Kaltblüterbakterien als erster auch verschiedene Stämme von *Myc. lacticola* untersuchte, extrahierte mit einem Gemisch von Äther und Aceton, obgleich bereits bekannt war, daß einige Wachssubstanzen des Tuberkelbazillus sich schwer in Äther lösen und die Phosphatide in Aceton überhaupt unlöslich sind. Seine Prozentzahlen sind daher niedrig (für *Myc. lacticola* im Höchstfall 16,47% des Trockengewichts). *Long* gibt nach Extraktion mit Alkohol und Petroläther etwas höhere Prozentzahlen an. In der Arbeit von *Long* und *Campbell* wird der Einfluß der Nährböden auf die Menge der gebildeten Lipoide behandelt und festgestellt, daß Glycerin der Lipoidbildung förderlich ist. Da die Autoren zur Kultur der extrahierten Bakterien dann einen Nährboden benutzten, der 5% Glycerin enthielt, sind ihre Prozentzahlen hoch (20,3 und 30,3% des Trockengewichts). Die einzige Arbeit, die sich ausschließlich mit den Fettsubstanzen des „*Timotheebazillus*“ beschäftigt, wurde von *Coghill* und *Bird* veröffentlicht. Nach diesen Verfassern ergab die Ätherextraktion 1,87%, die Chloroformextraktion 0,85% des Trockengewichts. Nach Behandlung der „entfetteten“ Bakterien mit heißer, 20%iger Salzsäure ergab eine nochmalige Chloroformextraktion aber noch zusätzlich 14,93% Fett. *Chargaff* und Mitarbeitern standen bei der Untersuchung des „*Grasbazillus*“ große Mengen von Bakterienmaterial zur Verfügung, das $1^1/_2$ Jahre lang in einem Gemisch von Alkohol und Äther zu gleichen Teilen im Dunkeln stehengelassen und dann 3 Tage geschüttelt wurde. Im, über einem dicken, gelblichen Niederschlag stehenden, klaren, roten Extrakt fanden sich 8,37% Totallipoide. Die durch diese „milde“ Art entfetteten Bakterien enthielten aber noch 10,2% Fettsubstanzen, die bei weiterer Behandlung mit Salzsäure und Kalilauge gewonnen wurden. Weitere Arbeiten über den Lipoidgehalt der Boden-*Mycobakterien* sind mir nicht bekannt.

Alle vorliegenden Arbeiten geben keinen genügenden Einblick in die angewandten Methoden. Diese lassen sich grundsätzlich einteilen in chemische und mechanisch-extraktive. *Pfannenstiel*, *Long*, sowie *Long* und *Campbell* verwendeten ausschließlich extraktive Methoden, die im einzelnen aber sehr ungenau beschrieben sind. Bei *Coghill* und *Bird* sowie *Chargaff* und Mitarbeitern wurden mechanisch-extraktive und chemische Arbeitsweisen miteinander verknüpft, doch sind die angewandten chemischen Hilfsmittel ganz verschieden. Ein Vergleich der Ergebnisse aus Methoden beider Art ist aber sehr unzuverlässig, sofern Art und Konzentration der chemischen Agentien nicht die gleiche ist und die Zertrümmerung des Bakterienmaterials

unvollkommen bleibt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeiten sind also zu einem zureichenden Vergleich nur bedingt brauchbar.

Da in neuerer Zeit wiederholt auf die Mangelhaftigkeit der chemischen Methoden hingewiesen (*Heide*) und die Überlegenheit einer befriedigenden Extraktionsmethode betont ist, wurde bei den im folgenden beschriebenen Untersuchungen die Anwendung aufschließender Methoden vermieden und die chemische Beeinflussung des Materials erst vorgenommen, als die mechanischen Methoden nicht weiterführten.

Die Untersuchungen wurden an den Stämmen 2, 3 und 4 durchgeführt. Das Kulturmedium bestand in allen Fällen aus neutralem Nähragar mit 3% Glycerin, das Alter der Kulturen betrug 25 bis 28 Tage. Die Bakterien ließen sich sämtlich vom Agar mit dem Spatel leicht ablösen, sie wurden sofort in ein getrocknetes und quantitativ gewogenes Glasgefäß getan und zunächst 48 Stunden bei 60° C zu ihrer Abtötung und der Inaktivierung der Enzyme vorgetrocknet und darauf bis zur Gewichtskonstanz bei 100° getrocknet. Das Material war dann vollständig brüchig und ließ sich leicht pulvern. Nach Abkühlung im Exsikkator und quantitativer Wägung wurde es mit Kieselgur in einer Achatschale mit Pistill aus gleichem Material von Hand solange zerrieben, bis bei 60facher Vergrößerung keine zu festen Verbänden zusammengeballten Bakterienhäufchen mehr erkennbar waren. Die fertig verriebenen Proben wurden in Extraktionsfilter „Schleicher u. Schüll, Blauband" eingefüllt und im Soxhlet-Apparat extrahiert.

Die Auswahl der Lösungsmittel wurde in Analogie zu den Untersuchungen am *Tuberkelbazillus* vorgenommen. Schon *Kresling* stellt für diesen eine Reihenfolge der Güte unserer gebräuchlichsten Lösungsmittel auf, die vom Chloroform über Benzol und Äther zum absoluten Alkohol geht. Benzol leistete als alleiniges Lösungsmittel die besten Dienste, die Ausbeute an Fett stand jedoch der mit kombinierter Anwendung von Chloroform, Äther und Alkohol erzielten etwas nach. *Goris* u. a. zogen ausschließlich mit Chloroform aus, nach den Erfahrungen *Kreslings* schien die oben angegebene Kombination jedoch vorteilhafter und daher wurde für die Stämme 2 und 3 die Reihenfolge Äther, absoluter Alkohol, Chloroform angewendet, während bei Stamm 4 zuerst mit Chloroform, darauf mit absolutem Alkohol und schließlich mit Äther ausgezogen wurde. Mit jedem Lösungsmittel wurde $2^1/_2$ Stunden extrahiert. Eine Übersicht über die bei den drei Stämmen erzielten Ergebnisse bietet die Tabelle VII.

Die Summe der entzogenen Lipoide in % des Trockengewichts der extrahierten Bakterien ist bei den drei Stämmen nicht sehr verschieden.

Tabelle VII.

Stamm	Gewicht der getrockneten Bakterien in g	Gewicht des Ätherextrakts in g	Mit Äther extrahierte Lipoide in % des Trockengewichts	Gewicht des Alkoholextrakts in g	Mit Alkohol extrahierte Lipoide in % des Trockengewichts	Gewicht des Chloroformextrakts in g	Mit Chloroform extrahierte Lipoide in % des Trockengewichts	Summe der entzogenen Lipoide in % des Trockengewichts
2	4,0145	0,2132	5,31	0,3537	8,81	0,0643	1,6	15,72
3	6,224	0,3373	5,42	0,5533	8,89	0,1064	1,71	16,02
4	3,7207	0,0376	1.01	0,3055	8,21	0,2482	6,67	15,89

Für das Endergebnis ist es also bedeutungslos, mit welchem der drei Lösungsmittel begonnen wird. Wird mit Chloroform begonnen, so lösen sich etwa 1,3 % an Lipoiden mehr in ihm, als sich in Äther lösen, wenn die Extraktion mit diesem angefangen wird. Chloroform ist also an sich ein besseres Lösungsmittel als Äther. Als ein recht gutes Lösungsmittel erwies sich in allen drei Fällen der absolute Alkohol. Der Ätherextrakt ist von hellgelber Farbe und angenehmem Geruch, der sich aber bald vermindert und schließlich ganz verschwindet, der Alkoholextrakt ist rotbraun und von stechendem Geruch, ebenso wie der dunkelgelbe Chloroformauszug.

Wurde der Bakterienrückstand nach diesen Extraktionen mit Sudan III untersucht, so erschien er so gut wie völlig fettfrei. Bei der Prüfung auf Säurefestigkeit aber ergab sich, daß die Bakterien in ihrer morphologischen Integrität nicht verändert und in ihrer Säureresistenz nicht wesentlich beeinflußt waren. Ein gleiches Ergebnis wurde bereits von *Long* nach seinen Extraktionen gefunden, und erst nach Behandlung des Rückstandes mit Salzsäure verschwand die Säurebeständigkeit der Bakterien. Der Rückstand der Stämme 2, 3 und 4 wurde daher ebenfalls in n Salzsäure gebracht und verblieb in ihr bis zu 60 Stunden. Eine nach Filtrieren und Auswaschen erfolgende neuerliche Extraktion mit Äther ergab dann für die Rückstände der Stämme 2 und 3 einen Lipoidgehalt von 3,6 bzw. 3,5 %, bei dem des Stammes 4 einen solchen von 3,9 % des Trockengewichts. Bei der mikroskopischen Untersuchung zeigte sich, daß die Morphologie der Organismen nicht mehr erhalten und die Säurefestigkeit vollständig verschwunden war.

Die erst nach der Säurebehandlung gewonnenen Lipoide waren also derartig fest im Bakterienleib verankert, daß einfache Extraktion mit fettlösenden Mitteln sie nicht freimachen konnte, und erst durch chemische Einwirkung ihre Extraktion gelang. Die Lipoidmoleküle sind offenbar mit den Plasmakolloiden innig verbunden, und diese Bindung verursacht höchstwahrscheinlich bestimmte Dispersitätsverhältnisse, die ihrerseits die Ursache der Säurefestigkeit darstellen. Die mit fettlösenden Mitteln dem Bakterienleib ohne weiteres entziehbaren Substanzen besitzen vermutlich als Reservestoffe für die Bakterien stoffwechsel-physiologische Bedeutung, stehen aber aller Wahrscheinlichkeit nach zur Säurefestigkeit in keiner direkten Beziehung, wenn auch ihr Vorhandensein das Phänomen überhaupt erst möglich machen dürfte.

Bei den Stämmen 2 und 3 wurde weiterhin der Prozentgehalt des Unverseifbaren gegenüber dem Betrag an Gesamtlipoiden ermittelt. Er geht aus der nachstehenden Zusammenstellung hervor (Tabelle VIII).

Die Bestimmung des Unverseifbaren wurde nach der Methode von *Fahrion* (*Klein*, Spez. Analyse I, 5, 630) vorgenommen, nach der das Unverseifbare als Äthylätherextrakt quantitativ erfaßt wird.

Tabelle VIII.

Stamm	Gesamtlipoide in % des Trockengewichts	Unverseifbares in % der Gesamtlipoide
2	19,32	15,37
3	19,62	15,45
4	19,79	—

Wie bereits erwähnt, stellten *Long* und *Campbell* den Prozentsatz an unverseifbaren Substanzen für eine Reihe von *Mycobakterien* fest. Sie gaben für einen „Dung-Bazillus" (vermutlich ein *Lacticola*-Stamm) das Unverseifbare mit 9,4% der Gesamtlipoide an. Bei allen Nicht-Pathogenen fanden die Verfasser einen verhältnismäßig niedrigen Satz an Unverseifbarem, die Organismen mit geringer Pathogenität (*Vogel-*, *Frosch-*, *Schildkrötenbazillus*) besaßen 35,1, 33,7 und 28,3% unverseifbare Stoffe, während die virulenten Formen des humanen und bovinen *Tuberkelbazillus* 77 und 60% von ihnen aufwiesen. Es scheint somit, als ob der Gehalt an unverseifbaren Substanzen in einer gewissen Beziehung zur Pathogenität stände.

Untersuchungen im Fluoreszenzmikroskop.

Nachdem die Fluoreszenzmikroskopie bereits längere Zeit zur Untersuchung histologischer Schnitte in Botanik und Zoologie Anwendung gefunden hatte, wurde sie 1937 von *Hagemann* in die Bakteriologie eingeführt. Dem Wesen der Fluoreszenz entsprechend werden bestimmte körperliche Elemente nach Vorbehandlung mit sogenannten Fluorochromen bei Bestrahlen mit ultraviolettem Licht befähigt, Licht von größerer Wellenlänge als der des auffallenden auszustrahlen, mit anderen Worten zum Leuchten gebracht. Die Methode von *Hagemann* wurde 1938 von *Herrmann* durch Verstärken der $CuSO_4$-Lösung und Veränderung der Färbetechnik erweitert, doch teilte kürzlich *Finke* mit, daß er mit den Modifikationen *Herrmanns* niemals bessere Ergebnisse erzielte und das Färbeverfahren *Hagemanns* sich als zuverlässiger gezeigt habe. Es wurde daher auch bei den hier vorgenommenen Untersuchungen verwendet. Die Fluoreszenzmikroskopie bewährte sich ausgezeichnet bei der Auffindung säurefester Bakterien und wird heute häufig zur Diagnose auf Tuberkelbazillen verwandt. An vergleichenden Untersuchungen mit verschiedenen *Tuberkelbazillen*-Typen und anderen Säurefesten liegt nur die Arbeit von *Finke* vor, der von Boden-*Mycobakterien* nur den „*Thimotheebazillus*" und einen Stamm von säurefesten *Milchbakterien* untersuchte.

Zu den hier angestellten Beobachtungen im Fluoreszenzmikroskop diente als Strahlenquelle eine 5 Amp. Kohlenfadenlampe mit Siemens-Plania-Kohlen. Die von *Hagemann* angegebene 2%ige $CuSO_4$-Lösung wurde gegen eine kalt gesättigte ausgetauscht, womit eine Verbesserung der Absorption der roten Strahlen erzielt wurde, wie das auch von *Herrmann* angegeben wird. Um zu vermeiden, daß ultraviolette Strahlen ins Auge drangen, wurde eine Okularsperrfilterkappe Lifa II verwendet, beobachtet wurde mit Trockenobjektiv Apochromat 20 und Okular 10 und 20, die Beobachtung fand ohne Deckglas statt[1]. Die Präparate wurden nach Flammenfixierung mit Auraminlösung 1 : 1000 Aqua dest. + 5% Phenol

[1] Für die freundliche Hilfe bei dem Aufbau des Mikroskops und der Durchsicht der Präparate bin ich Herrn Dozent Dr. *R. Meyer* zu großem Dank verpflichtet.

liquefac. 15 Minuten gefärbt, mit Leitungswasser abgespült und mit salzsaurem Brennspiritus (1000 ccm Brennspiritus, 4 ccm konz. reine HCl, 4 g NaCl) 3 Minuten differenziert, wobei nach $1^1/_2$ Minuten der Brennspiritus erneuert wurde. Eine Gegenfärbung wurde nicht gemacht.

Beim Durchmustern zeigten alle *Lacticola*-Stämme eine helle Fluoreszenz, die aber den goldgelben Ton der *Tuberkelbazillus*-Fluoreszenz nicht erreichte, sondern mehr grünlich leuchtete. Es fluoreszierten aber nicht nur „wenige, meist sehr kurze, Stäbchen", wie *Finke* schreibt; das Gesichtsfeld bot vielmehr das Bild ungleich langer, leuchtender Stäbchen in großer Menge dar, Bakterienhäufchen zeigten eine beträchtliche Leuchtkraft, die jedoch hinter der von zusammengeballten *Tuberkelbazillen* zurückblieb und, wie erwähnt, weniger goldgelbe Farbtönung aufwies. Ebenso fluoreszierten *Myc. eos* und *luteum*. Alle *Phlei*-Stämme zeigten ebenfalls gute Fluoreszenz, die Helligkeit zusammengeballter Häufchen fiel aber deutlich gegenüber der von *Lacticola*-Stämmen ab, und der Ton einzeln liegender Stäbchen war mehr graugrün, auch war die Zahl der fluoreszierenden Stäbchen geringer. Bemerkenswerterweise war eine schwache, aber deutliche Fluoreszenz auch bei den *Proactinomyceten* festzustellen. Hierauf wurde auch ein aus Erlenknöllchen isolierter, als Stamm 10 bezeichneter (*v. Plotho*) *Actinomycet* untersucht, der reichlich mit Fett- und Wachsstoffen inkrustiert ist und dessen Mycel eine gewisse Säurefestigkeit besitzt. Auch er zeigte geringe, wenn auch lichtschwache graugrünliche Fluoreszenz in mehr oder weniger langen Fadenstücken und einzelnen Sporen. Die Prüfung eines anderen, in der angegebenen Arbeit mit Stamm 3 bezeichneten *Actinomyceten*, dem jede Säurefestigkeit fehlt, fiel jedoch negativ aus, es konnte keine Spur von Fluoreszenz festgestellt werden.

Es scheint nach diesen Beobachtungen, als ob Fluoreszenz und Säurefestigkeit auf den gleichen Voraussetzungen beruhen. Wie die Säurefestigkeit nach den oben mitgeteilten Versuchen bedingt zu sein scheint durch eine bestimmte von den Lipoidsubstanzen verursachte Dispersität der Plasmakolloide, so dürfte auch die Fluoreszenz mit dieser besonderen Struktur der Proteine zusammenhängen. Es bilden also wahrscheinlich auch für sie physikalisch-chemische Verhältnisse die Grundlage.

Das Verhalten der Mycobakterien auf verschiedenen Nährböden.

In der Literatur finden sich nur wenige Untersuchungen, die das Verhalten der *Mycobakterien* auf verschiedenen Nährmedien behandeln. Am häufigsten wurden auch nach dieser Richtung hin die hochvirulenten *Tuberkelbazillen* beobachtet und schon früh wurde festgestellt, daß das Hinzufügen von Glycerin zum Nährmedium bei ihnen das Wachstum erhöht. *Maaßen*, der zum erstenmal an 52 Bakterienarten einen Überblick

über Stoffwechselvorgänge bei Mikroorganismen gab, zeigte, daß *Myc. Tuberculosis* in keiner der gewöhnlichen Nährlösungen mit Pepton und Salzen organischer Säuren wächst, daß er jedoch zur Entwicklung gelangt, wenn die Medien einen Zusatz von 9‰ Glycerin erhielten. 10 Jahre später demonstrierte *Theobald Smith* die gleiche Wirkung dieses Substrats und noch in jüngster Zeit bezeichneten französische Forscher (*Fernbach* u. *Rullier*) die wachstumsfördernde Wirkung des Glycerins auf den *Tuberkelbazillus* als geradezu spezifisch. Es war daher interessant, festzustellen, ob sich diese Wirkung bei den verwandten Bodenbakterien auch nachweisen ließ.

Als Nährsubstrat wurde Fleischextrakt-Pepton-Bouillon mit 3% Glycerin gewählt. In den Vergleichslösungen befanden sich dem Glycerinzusatz äquivalente Mengen von Mannit und Dextrose. Beim Abbrechen des Versuchs wurden die Kulturflüssigkeiten durch quantitativ gewogene Filter filtriert und der Rückstand auf ihnen bei Zimmertemperatur getrocknet und gewogen. Es wurden stets 2, oft 3 Parallelkulturen angelegt, die Zahlen stellen daher die Durchschnittsergebnisse mehrerer Versuche dar. Auch die Angaben der weiter unten aufgeführten Tabellen X bis XIV sind immer Durchschnittswerte aus 2 oder 3 Parallelversuchen.

Die Tabelle IX läßt erkennen, daß die wachstumsfördernde Wirkung des Glycerins auch für *Myc. testudinis* und die *Lacticola*-Stämme besteht. Der *Schildkrötenbazillus* wächst sehr langsam, aber auch bei ihm ist ein deutlicher Vorsprung der Glycerinkultur unverkennbar. Die Stämme 2 und 4 hatten sich dem Mannitnährboden gegenüber um etwa $^1/_3$ besser entwickelt; nicht ganz so groß war der Vorsprung gegenüber dem Dextrosemedium, doch auch hier ist er sehr beträchtlich. Die nahe Verwandtschaft der genannten Stämme zum *Tuberkelbazillus* wird durch dieses Ergebnis aufs neue erwiesen. Interessant ist auch die Wachstumsförderung, die der Stamm 14 durch das Glycerin erfährt. Bei ihm ist sie den anderen Nährböden gegenüber noch größer. Die übrigen Stämme, besonders der Vertreter der *Proactinomyceten*

Tabelle IX.

25 ccm Nährlösung. Ausgangs-p_H 6,6. Alter der Kulturen 14 Tage.

Stamm	3 % Glycerin			2,967 % Mannit			2,92 % Dextrose		
	Gewicht in mg	End-p_H	Milchsäurebildung	Gewicht in mg	End-p_H	Milchsäurebildung	Gewicht in mg	End-p_H	Milchsäurebildung
1	18,9	6,6	±	15,2	6,6	±	13,3	6,6	++
2	368,8	7,2	±	238,1	7,2	±	312,8	7,0	+
4	333,6	7,2	±	237,6	7,2	±	252,3	7,2	+
8	139,4	6,8	—	245,7	7,0	—	203,4	7,0	+
14	274,3	7,2	±	129,5	7,2	±	99,5	7,0	++
16	24,7	6,0	+	134,6	5,8	+	100,3	5,8	+
17	89,3	6,4	+	102,3	6,2	+	117,4	6,4	++
21	61,9	6,6	±	133,0	7,0	—	283,9	7,0	+
27	149,1	6,6	±	211,3	6,9	±	141,9	7,0	++

++ = reichliche Bildung von Milchsäure; + = Milchsäurebildung; ± = schwache Milchsäurebildung.

(Stamm 21), wachsen jedoch weitaus besser auf dem Zuckernährboden oder auf Mannit, sie entfernen sich also auch in ihren kulturellen Eigenschaften mehr und mehr vom *Mycobakterium-Typus*.

Aus der Tabelle ist weiter ersichtlich, daß die Stämme 2, 4, 8, und 14 alle drei Medien alkalischer machen, während die übrigen eine Erhöhung der Acidität in den Substraten, oder doch nur ein geringes Absinken der H-Ionen bewirken. Bei längerer Kulturdauer steigt zunächst bei den genannten vier Stämmen die Alkalität noch bis auf etwa p_H 8 an, dann tritt eine langsame Erhöhung der H-Ionenkonzentration ein und die Nährlösungen werden schließlich sauer. Bei den übrigen Stämmen werden die Medien bei längerer Kulturzeit noch etwas saurer, dann fällt aber die Acidität, wahrscheinlich infolge autolytischer Vorgänge, langsam ab. Zur Erklärung dieser Unterschiede im Reaktionsverlauf ist zu sagen, daß die Stämme 2, 4, 8 und 14 die am schnellsten wachsenden Organismen sind, so daß eine Säurebildung bei ihnen wahrscheinlich anfangs überdeckt wird durch eine überaus starke Bildung von alkalischen Abbauprodukten, die bei den langsamer wachsenden Formen in der gleichen Zeit nicht in so großer Menge entstehen und die Säurebildung also hervortreten kann. Außerdem werden organische Säuren in großem Umfang sicher nicht gebildet. Die einzige Säure, die sich fast immer in mehr oder weniger großer Menge fand, war die Milchsäure, die mit der Reaktion nach *Denigès* (*Bernhauer*) nachgewiesen wurde. Diese Reaktion ist außerordentlich empfindlich, ihr Ausfall ist bereits bei einem Bruchteil von Milligrammen Milchsäure positiv. Eine ältere Methode zum Milchsäurenachweis mit Ätherextrakt und Eisenchloridlösung (*Seifert* und *Müller*) versagte häufig, wo nach *Denigès* noch das Vorhandensein der Säure deutlich nachgewiesen werden konnte. Hierauf ist wahrscheinlich die Mitteilung von *Merril*, der die zweite Methode benutzte, zurückzuführen, daß Milchsäure bei *Myc. lacticola* und *phlei* nie nachzuweisen sei. Ihre Bildung kann jedoch nicht zweifelhaft sein.

Für die späteren Untersuchungen war es notwendig, einen Nährboden von genau bekannter Zusammensetzung zu benutzen. Nach verschiedenen Versuchen mit anderen synthetischen Lösungen wurde in der Folge immer die verhältnismäßig einfache Kombination benutzt, die von *Jensen* (1934) für *Mycobakterien* und *Corynebakterien* verwendet wurde. Sie enthält: Dextrose 1%, K_2HPO_4 0,1%, $MgSO_4$ 0,05%, NaCl 0,05%. Über die Wirkung einiger der gebräuchlichsten Stickstoffquellen in Gemeinschaft mit dieser Lösung unterrichtet Tabelle X.

In der Tabelle tritt die Überlegenheit des Ammoniumphosphats als N-Quelle deutlich hervor. Es ist erstaunlich, welchen Vorsprung vor den anderen die *Lacticola*-Stämme auf diesem Medium erreichen. Der Wachstumsertrag des Stammes 2 z. B. übertrifft auf ihm um mehr als das Doppelte den des nächstbesten Substrats. Für die Vertreter

Tabelle X.

25 ccm Nährlösung. Alter der Kulturen 28 Tage. Ausgangs-p_H 6,8.

Stamm	0,2 % NH_4Cl		0,2 % $NaNO_3$		0,2 % $(NH_4)_2SO_4$		0,2 % $(NH_4)_2HPO_4$	
	Gewicht in mg	End-p_H	Gewicht in mg	End-p_H	Gewicht in mg	End-p_H	Gewicht in mg	End-p_H
2	20,5	4,0	45,5	7,2	19,5	4,3	92,6	5,7
4	18,6	3,9	62,5	7,2	14,5	4,3	77,7	5,6
6	14,3	5,4	19,0	7,3	18,2	4,7	48,7	6,6
8	4,6	4,9	5,3	6,4	17,5	5,6	10,2	6,3
14	3,3	4,5	6,5	5,4	16,6	4,8	10,8	6,4
21	4,6	5,8	5,7	6,8	12,4	5,6	11,3	6,6

der anderen Arten ist der Unterschied gegenüber der Ammoniumchlorid- und der Natriumnitratlösung genau so beträchtlich, die Ammonsulfatlösung schneidet aber besser ab. Sie ist überhaupt für die Stämme 8, 14 und 21 nicht ungeeignet, und Ammonsulfat scheint sich bei anderer Zusammensetzung der Nährlösung im allgemeinen gut zu bewähren, denn *Frey* und *Hagan* benutzten es bei ihren zahlreichen Isolierungen aus Böden in synthetischen Lösungen als N-Quelle. In meinen Versuchen blieben die *Lacticola*-Stämme jedoch immer sehr stark zurück, was sicher zum großen Teil auf die während des Kulturverlaufs eintretende starke Verschiebung der p_H-Werte in den sauren Bereich infolge der Aufspaltung des Ammonsulfats zurückgeführt werden muß. Wenn auch nach anderen, hier nicht mitgeteilten Versuchen die Spanne der Reaktionsgrenzen, innerhalb derer Wachstum stattfindet, bei den betreffenden Stämmen außergewöhnlich groß ist, und etwa von p_H 4 bis p_H 10 reicht, so verlangsamt sich doch die Wachstumsgeschwindigkeit bei Annäherung an diese Grenzen beträchtlich und eine volle Entwicklung der Kulturen wird in der Nähe der Grenzwerte überhaupt nicht erreicht. Die starke Ansäuerung dürfte auch ein Grund sein für die besonders unbefriedigende Entwicklung in der Ammonchloridlösung, außerdem macht sich aber auch in ihr die schädigende Wirkung des Chlorions geltend. In der Nitratlösung ist das End-p_H dem Ausgangsstadium gegenüber nicht allzu stark verschoben, doch ist hier das NO_3-Ion wahrscheinlich der Entwicklung abträglich, so daß auch dieses Medium in seiner Wirkung allzu weit hinter der Ammonphosphatlösung zurückbleibt. Für die späteren Versuche wurde daher stets Ammonphosphat als N-Quelle in synthetischen Lösungen benutzt.

Erst verhältnismäßig spät wurde die Verwendbarkeit der Kohlenhydrate durch die Boden-*Mycobakterien* gesichert. Es gibt eine Reihe älterer Arbeiten (*Keudel* und Mitarbeiter, *Long* und *Majer*), die die Vergärungsmöglichkeit dieser Verbindungen bestreiten. Durch *Braun* und seine Mitarbeiter wurden dann später systematische Reihenversuche über den Verwendungsstoffwechsel der Bakterien unternommen und gezeigt, daß die saprophytischen *Mycobakterien* in synthetischen Nährböden mit

viel verschiedenartigeren C-Quellen auszukommen vermögen als die pathogenen. Dennoch berichten auf Grund von Reaktionskurven *Weinzirl* und *Knapton* noch 1927, daß Dextrose und Lactose in synthetischen Lösungen nicht vergoren würden. Durch die Arbeit von *Merrill* (1930), der als erster eine quantitative Bestimmung der Zucker in den Nährlösungen nach verschiedenen Kulturtagen vornahm, wurde endlich die Ausnutzbarkeit der Kohlenhydrate durch *Mycobakterien* sichergestellt. In neuester Zeit prüfte *Cutinelli* mit der manometrischen Methode nach *Warburg* die Verwendbarkeit der Kohlenhydrate durch den *Tuberkelbazillus* und fand, daß Mannose, Lävulose und Galaktose in absteigender Geschwindigkeit angegriffen werden. Von den Disacchariden werden Maltose gut, Saccharose mäßig ausgenutzt, Pentosen und Polysaccharide sind nicht verwendbar.

Die in der Tabelle XI aufgeführten Kulturen wuchsen in Reagensgläsern, die 7 ccm einer Nährlösung enthielten, die aus den oben angegebenen Salzen + 0,2% $(NH_4)HPO_4$ bestand. Dazu kam jeweils 1% der Kohlenhydrate. Die Zahlen geben die Menge der gewachsenen lufttrockenen Bakterien in mg an.

Die Tabelle zeigt, daß von den Hexosen die Monosaccharide Glucose, Lävulose und Mannose etwa gleich gut verwertet werden, etwas geringer erscheint die Ausnutzbarkeit der Galaktose. Auffallend ist demgegenüber die außerordentlich schlechte Verwertbarkeit der Saccharose. Die beiden Stämme von *Lacticola perrugosum* sind auf ihr überhaupt nicht gewachsen. Hierauf wurden die übrigen Stämme von *Lacticola perrugosum* gesondert geprüft. Die Stämme 3 und 6 zeigten nicht die geringste, Stamm 5 nur eine schlechte Entwicklung. Dagegen konnte *Lacticola planum* Rohrzucker verhältnismäßig gut verwerten, was wiederholt geprüft wurde. Bei allen anderen Stämmen ist ebenfalls die Entwicklung in Rohrzucker äußerst mäßig. Es muß somit für die Boden-*Mycobakterien* der Abbau des Moleküls über die beiden Monosaccharide unmöglich sein und eine Verarbeitung des ungeteilten Moleküls nur schwer gelingen. Dagegen wird die Maltose allgemein besser, wenn auch nicht gut, verarbeitet und besonders auch von den *Lacticola*-Stämmen angegriffen.

Das Trisaccharid Raffinose ist eine so schlechte Kohlenstoffquelle, daß es den meisten Stämmen nur ein derartig geringfügiges Wachstum ermöglicht, daß das Gewicht der entwickelten Bakterien nicht festgestellt werden konnte. Merkwürdig ist das verhältnismäßig gute Gedeihen von Stamm 14. Die Stärke wurde als C-Quelle von keinem der geprüften Stämme verarbeitet, niemals war das geringste Wachstum festzustellen. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von *Cutinelli* am *Tuberkelbazillus* stehen die Wachstumsbefunde bei den Pentosen. Fast alle Stämme gediehen auf ihnen gut bis sehr gut, insbesondere wuchsen auch die beiden Vertreter von *Lacticola perrugosum* durchaus befriedigend. Nur der *Lacticola planum*-Stamm war so kümmerlich gewachsen, daß das Gewicht der Bakterien nicht festgestellt werden

Tabelle XI. Alter der Kulturen 21 Tage. Anfangs-p_H 6,8 bis 7. Kulturtemperatur 35° C.

Stamm	Hexosen														Pentosen				Polyosen
	Monosaccharide								Disaccharide				Trisaccharide						
	Dextrose	End-p_H	Lävulose	End-p_H	Galaktose	End-p_H	Mannose	End-p_H	Saccharose	End-p_H	Maltose	End-p_H	Raffinose	End-p_H	Xylose	End-p_H	Arabinose	End-p_H	Stärke
2	20,5	4,3	19,6	4,7	14,8	5,0	20,8	4,8	nicht gewachsen	6,8	5,6	6,4	Gew. nicht feststellbar	6,8	15,0	4,8	16,7	4,7	nicht gewachsen
4	16,5	4,5	17,1	4,7	16,3	4,5	16,1	4,5	dasselbe	6,8	5,4	6,2	dasselbe	6,8	11,8	4,7	17,4	4,5	dasselbe
7	18,5	4,7	14,6	4,5	15,5	4,9	18,5	4,9	9,1	6,2	6,4	—	„	6,8	Gew. nicht feststellbar	—	Gew. nicht feststellbar	6,8	„
8	11,6	5,3	15,5	5,0	8,6	6,6	13,6	5,4	6,6	5,6	5,5	6,6	„	6,8	10,8	4,7	7,6	6,2	„
10	9,8	5,0	16,3	5,2	9,1	6,0	10,9	5,8	7,6	5,4	8,0	6,4	„	6,8	10,9	—	5,8	—	„
14	9,8	4,3	6,6	4,7	5,4	5,9	10,1	4,7	3,6	5,2	5,1	6,0	4,8	4,7	8,8	4,0	9,4	4,9	„
21	15,5	6,4	11,3	6,0	7,8	6,6	12,5	6,2	5,6	—	4,5	6,6	2,2	6,6	14,2	5,3	6,6	6,4	„
27	10,1	5,4	14,8	5,2	9,3	6,0	12,4	5,4	3,7	—	4,2	—	Gew. nicht feststellbar	6,6	10,7	—	6,7	6,2	„

Tabelle XII. 0,1% Säure, Anfangs-p_H 6,8 bis 7. Alter der Kulturen 22 Tage. Kulturtemperatur 35° C.

Stamm	Ameisensäure		Essigsäure		Oxalsäure		Bernsteinsäure		Weinsäure		Citronensäure		Milchsäure		Brenztraubensäure	
	Gewicht in mg	End-p_H	Gewicht in mg	End-p_H	Gewicht in mg	End-p_H	Gewicht in mg	End-p_H	Gewicht in mg	End-p_H	Gewicht in mg	End-p_H	Gewicht in mg	End-p_H	Gewicht in mg	End-p_H
2	kein Wachstum	6,6	13,4	7,4	kein Wachstum	7,2	21,8	6,8	kein Wachstum	7,0	kein Wachstum	7,0	12,6	6,8	15,2	7,0
3	dasselbe	6,6	12,6	7,4	dasselbe	7,2	20,9	6,7	dasselbe	6,8	dasselbe	7,0	8,1	6,8	14,8	7,0
8	„	6,5	10,9	7,6	„	7,0	12,6	7,4	6,9	7,2	8,6	7,2	12,1	6,8	7,7	6,8
16	„	6,4	Gew. nicht feststellbar	6,6	„	7,0	Gew. nicht feststellbar	6,8	kein Wachstum	6,6	kein Wachstum	7,0	kein Wachstum	—	Gew. nicht feststellbar	6,6
14	„	6,5	dasselbe	6,8	Gew. nicht feststellbar	7,0	16,5	7,6	dasselbe	6,6	4,2	7,4	5,9	6,8	3,3	6,8
21	„	6,4	6,7	7,2	dasselbe	7,0	10,4	7,2	„	6,6	12,4	7,4	8,9	6,9	7,0	7,0
27	„	6,4	7,9	7,6	kein Wachstum	6,8	9,8	7,2	„	6,7	3,7	7,2	9,3	6,4	3,1	6,6

konnte. Nach *Bergey* ist dieses Verhalten bei Kultur auf Arabinose charakteristisch für die *Mycobakterien*, die zu seiner Untergruppe 1b gehören, in der *Lacticola planum* steht. Auch das Wachstum von Stamm 7 auf Rohrzucker spricht nach *Gordon* und *Hagan* für seine Zugehörigkeit zu dieser Untergruppe der amerikanischen Forscher. Kürzlich haben allerdings *Rippel* und Mitarbeiter darauf hingewiesen, daß die Verarbeitung von Zuckern, organischen Säuren und sonstigen C-Quellen so stark von der Konzentration der Stoffe und anderen Kulturbedingungen abhängt, daß eine systematische Verwertbarkeit äußerst problematisch erschiene. In diesem Falle dürfte das kulturelle Verhalten aber wohl herangezogen werden, da die daraus folgende systematische Stellung übereinstimmt mit derjenigen, die dem Stamm 7 auf Grund seiner morphologischen Eigenschaften ohnehin zugewiesen werden müßte.

In weiteren Versuchen wurden organische Säuren als Kohlenstoffquelle für die *Mycobakterien* geprüft. Ihre Wirkung wurde nach der älteren Verwendungsstoffwechselmethode festgestellt durch Beobachtung wachsender Bakterien in den Lösungen der betreffenden Säuren. In neuerer Zeit verwendet die biochemische Forschung zum Säureabbau durch Mikroorganismen häufig die Methode der „ruhenden“ Bakterien (*Braun* und *Vasarhelyi*, *Franke* und *Peris*). Erst kürzlich wies aber *Rippel* darauf hin, daß für die rein biologische Betrachtung diese Methode primär weniger geeignet sei, da es sich für den Biologen in erster Linie darum handele, „die Wirkung des Zusammenspiels aller gegebenen Möglichkeiten im Lebensablauf zu erfassen, worüber das Herausnehmen nur eines, sozusagen stationären Vorganges, noch keinen Aufschluß geben kann.“ Für andere Bakterien liegen nach der älteren Methode auf dem Gebiet der Verwendungsmöglichkeit organischer Säuren zahlreiche Untersuchungen vor. Für die saprophytischen *Mycobakterien* finden sich in der Literatur jedoch keinerlei Angaben, daher dürften die nachfolgenden Darlegungen, zumal in ihrer quantitativen Durchführung, gerechtfertigt erscheinen.

Die Nährlösungen der in der Tabelle XII zusammengestellten Kulturen sind die gleichen wie die in der Tabelle XI, nur ist jeweils 0,1% der zu prüfenden Säure als Kohlenstoffquelle an Stelle der Kohlenhydrate hinzugefügt und der p_H-Wert auf 6,8 bis 7,0 gebracht. Höhere Säurekonzentrationen erwiesen sich besonders bei der Milch- und Brenztraubensäure als schädigend, vielleicht wegen der großen Menge Alkali, das zur Neutralisisierung dieser weitgehend dissoziierten Säuren in die Lösung hineingebracht werden mußte.

Wie aus der Tabelle ersichtlich, ist von den beiden niederen gesättigten Monocarbonsäuren nur die Essigsäure zur Synthese neuer Zellsubstanz brauchbar. Die Ameisensäure wird zwar, was aus der Änderung der p_H-Werte hervorgeht, angegriffen, ihre Abbauprodukte können aber offenbar zum Aufbau der Leibessubstanz der *Mycobakterien* nicht verwertet werden, bei keinem Stamm war auch nur das geringste Wachstum eingetreten. *Quastel* berichtete bereits 1925 über die Unbrauchbarkeit dieser Säure für viele Bakterien und bestätigte seine

Ergebnisse später mit Hilfe verhältnismäßig neuer Methoden, insbesondere der *Thunberg*schen Methylenblautechnik. Die *Mycobakterien* verhalten sich also der Ameisensäure gegenüber nicht anders wie die meisten Mikroorganismen. Im Gegensatz zu ihr gehört die Essigsäure zu der Reihe zellvertrauter Substrate, die von fast allen Bakterien leicht angegriffen werden. Sie besitzt auch für die *Mycobakterien* eine recht gute Eignung als Zellbaustoff. Von den untersuchten Organismen war nur Stamm 16 so kümmerlich auf ihr gewachsen, daß das Gewicht der Bakterien nicht festgestellt werden konnte. Er scheint aber gegenüber der C-Quelle besonders anspruchsvoll zu sein, denn er erreichte in keiner Lösung der Tabelle XII eine befriedigende Entwicklung. Unter den gesättigten zweibasischen Fettsäuren zeichnen sich die Oxalsäure und die Weinsäure durch sehr geringe Verwertbarkeit aus. Die letztere wird nur von dem immer kräftig wachsenden Stamm 8 ausgenutzt, aber auch bei ihm kommt es nur zu einer mäßigen Entfaltung. Die Bernsteinsäure wird dagegen in erheblichem Umfang angegriffen und ihre Spaltprodukte werden als Aufbaumaterial offenbar leicht verwendet. Die Stämme 2, 3, 8 und 14 erreichten in ihr die höchsten Gewichtszahlen unter allen geprüften Säuren. Auch dieses Ergebnis weicht nicht ab von den Erfahrungen mit vielen anderen Bakterien in dem gleichen Substrat. Merkwürdig aber ist das Ergebnis aus der Lösung der Citronensäure. Sie wird in den Untersuchungen von *Braun* und Mitarbeitern sowie in neueren Literaturangaben (*Sonderhoff* und *Deffner*) übereinstimmend als sehr gutes Baumaterial bezeichnet. In den vorliegenden Versuchen zeigte sie sich aber durchaus nicht als solches. Die beiden *Lacticola*-Stämme und der *Eos*-Stamm waren gar nicht, der Stamm 27 spärlich, auch die Stämme 8 und 14 nur sehr mäßig entwickelt. Nur der Vertreter der *Proactinomyceten* (Stamm 21) war gut gediehen. Ob hier ein für alle *Mycobakterien* spezifisches Verhalten vorliegt, müßten weitere Versuche klären. Milchsäure und Brenztraubensäure sind in vielen Stoffwechseluntersuchungen

Tabelle XIII.

7 ccm Nährlösung, Anfangs-p_H 6,8. Alter der Kultur 18 Tage. Kulturtemperatur 35° C.

Stamm	Citronensäure		Stamm	Citronensäure	
	Gewicht in mg	End-p_H		Gewicht in mg	End-p_H
1–6	nicht gewachsen	6,6–6,8	17	5,2	7,2
7	5,5	7,2	19	5,4	7,0
10	2,4	7,0	20	4,0	7,2
11	4,8	7,4	22	3,6	7,2
12	5,2	7,1	23	3,2	7,2
13	3,2	7,0	25	12,5	7,4
15	nicht gewachsen	6,6	26	3,9	7,4

Tabelle XIV. Alter der Kulturen 28 Tage. Anfangs-p_H 7,0. Kulturtemperatur 35° C, 25 ccm Nährlösung.

Stamm	0,113 % Glykokoll			0,198 % Leucin			0,1 % Asparagin			0,135 % Alanin		
	Gewicht in mg	End-p_H	Milchsäure	Gewicht in mg	End-p_H	Milchsäure	Gewicht in mg	End-p_H	Milchsäure	Gewicht in mg	End-p_H	Milchsäure
2	37,9	7,2	+	90,0	6,8	–	56,3	7,0	±	66,6	6,8	±
4	41,5	7,0	+	69,4	6,8	–	44,1	7,0	±	56,2	7,0	±
8	34,9	6,6	+	58,2	6,6	±	31,9	6,6	±	57,3	6,8	–
10	30,1	6,5	+	49,7	6,8	+	48,8	6,4	±	50,8	6,8	–
14	12,7	4,5	++	12,2	4,5	++	13,2	5,6	+	–	5,8	+
17	14,9	6,4	+	14,3	5,4	+	22,5	5,4	++	5,4	5,4	++
18	98,1	5,6	+	–	6,4	±	56,9	5,8	+	–	5,8	+
21	104,5	6,8	+	70,0	6,6	±	44,5	6,6	+	38,1	6,6	±
27	10,1	4,7	++	8,7	4,5	++	9,2	4,7	++	7,4	4,8	+

— = keine Milchsäurebildung; ± = wenig Milchsäurebildung; + + = viel Milchsäurebildung.

als hervorragende Kohlenstoffquelle erkannt worden, sie erwiesen sich auch in den vorliegenden als solche.

Im allgemeinen erschienen also die gleichen Substrate, die generell in mehr oder weniger großem Umfang von allen Bakterien ausgenutzt werden können, auch für die *Mycobakterien* als brauchbar. Um die Verwendbarkeit der Citronensäure für die übrigen untersuchten Stämme festzustellen, wurden diese sämtlich in ihr kultiviert. Die Tabelle XIII gibt die Zusammenfassung der Ergebnisse.

Alle Stämme, mit Ausnahme von Stamm 25, sind in der Citronensäure sehr mäßig entwickelt. Es ist vorderhand nicht möglich, für diese Erscheinung eine Ursache anzugeben.

An vergleichenden Untersuchungen über die Verwendung der Aminosäuren als Stickstoffquelle durch *Mycobakterien* sind mir ebenfalls keine Arbeiten bekanntgeworden. Außer den Mitteilungen von *Jensen* (1934) über das Wachstum einiger Stämme auf synthetischem Nährboden mit Asparagin als N-Quelle liegen über die Brauchbarkeit dieser Säuren keine Beobachtungen vor. Die hier durchgeführten Versuche sind in der Tabelle XIV zusammengefaßt. Die Lösungen enthalten jeweils die 0,1% Asparagin äquivalente Menge an Aminosäure, 1% Dextrose und Mineralsalze in der auch von *Jensen* benutzten Kombination (K_2HPO_4 0,1%, $MgSO_4$ 0,05%, NaCl 0,05%).

Im allgemeinen wurden, wie Tabelle XIV zeigt, alle Aminosäuren gut ausgenutzt, das Leucin stellt durchschnittlich wohl die beste N-

Quelle dar. Die Stämme 14 und 27 entwickelten sich am schlechtesten, was auf die reichliche Bildung saurer Abbauprodukte zurückzuführen sein dürfte.

Die Kultur der Mycobakterien in Milch.

Milch ist für alle hier untersuchten Stämme kein guter Nährboden. Sämtliche Formen bilden in ihr eine schwache Oberflächenhaut und wenig Sediment von der Farbe, wie sie sich auch in Fleischextrakt-Pepton-Bouillon entwickelt. An den Formelementen sind häufig involutionsartige Veränderungen nachweisbar. Die *Lacticola*-Stämme bilden z. B. im Sediment sehr feine, dünne Fäden von ungleicher Länge, 0,8 — 1,3 × 3 — 7 μ, die in sehr feine Kokkoide zerfallen (Stamm 6). Die Bildung säurefester Granula wurde bereits ausführlich besprochen. Sie fanden sich im Sediment häufig außer bei den *Lacticola*-Stämmen auch in den Stäbchen, sowie frei in der Milch bei Stamm 14. In lebenden Präparaten leuchten sie bei hoher Tubuseinstellung auf. Wird zum lebenden Sediment *verdünnte* Methylenblaulösung hinzugefügt, so nehmen die Granula den Farbstoff nicht auf. Nur nicht mehr voll lebensfähige Elemente lassen ihn eintreten und färben sich dunkelblau. Das verhältnismäßig häufige Vorkommen von Granula (vgl. oben, S. 115) kann, wie erwähnt, zurückgeführt werden auf das ungünstige Kulturmedium. Auch im Oberflächenhäutchen von Stamm 14 lassen sich viele, stark verlängerte, in der Mitte oder an den Polen aufgetriebene Stäbchen und sonstige Involutionsformen erkennen. Bei den *Eos*-Stämmen (Stämme 15 und 17) kommen in 4 Wochen alten Milchkulturen in Oberflächenhaut und Sediment bis zu 10 μ lange, verdickte Stäbchen vor, in denen sich nach Färbung mit Carbolfuchsin und Behandlung mit 5%iger Schwefelsäure stark säurefeste Strukturen nachweisen lassen, die teilweise fast die ganze Länge der Stäbchen ausfüllen und in ihrem Verlauf regelmäßige Einschnürungen zeigen, teils als kugelige Körperchen in den Stäbchen liegen. Die *Phlei*-Stämme und *Proactinomyceten* zeigen ebenfalls zahlreiche Involutionsformen in Oberflächenhaut und Sediment (Stämme 8, 22, 24). Im allgemeinen ist die Säurefestigkeit in alten Milchkulturen größer als in gleichaltrigen Kulturen von Nährbouillon mit Dextrosezusatz (Stamm 17), die Erhöhung ist jedoch bei vielen Stämmen nicht beträchtlich.

Die Milch wird von allen Stämmen nicht koaguliert und nicht peptonisiert, keiner der hier untersuchten Stämme kann also Milch verdauen. In alten Kulturen findet als charakteristische Veränderung eine langsame Aufhellung der Milch statt, die aber keine Koagulation ist. Die Milch wird halb transparent, opalisierend und zäh; nach *Jensen* (1934) soll sie in 3 Monate alten Kulturen sogar ganz gelatinös sein.

Jensen hält den Vorgang für irgendeinen physikalischen Effekt auf das Casein.

Die Reaktion der Milch wird nach wenig Kulturtagen alkalischer und die Konzentration der H-Ionen sinkt bei längerer Kulturdauer weiter ab, wie die Tabelle XIV zeigt.

Tabelle XV.

Stamm	H-Ionen-Konzentration nach Tagen		Beschaffenheit der Milch nach Tagen	
	9	42	9	42
3	6,4	7,8	unverändert	halb transparent
4	6,7	7,4	„	aufgehellt
8	7,1	7,2	„	„
14	6,6	6,9	„	halb transparent
15	6,2	6,4	„	unverändert
21	7,2	7,5	„	opalisierend, zäh
27	7,0	7,6	„	„ „

Die Kulturen wuchsen in Reagensgläsern mit 7 ccm Inhalt, das Ausgangs-p_H betrug 6,2, die Kulturtemperatur 35° C.

Die aus der Tabelle XV ersichtliche alkalische Reaktion der Kulturen kann wenigstens anfänglich nicht auf die Bildung von Ammoniak aus Eiweißzersetzung zurückgeführt werden, wie das bei vielen Bakterien der Fall ist, denn auch nach 3 Wochen Kulturdauer konnte kein Ammoniak nachgewiesen werden. Die Milch bleibt vielmehr während der ersten 2 bis 3 Wochen der Kultur ganz unverändert und beginnt erst dann die besprochenen Veränderungen zu zeigen. Die alkalische Reaktion dürfte höchstwahrscheinlich hervorgerufen werden auf Grund der Bildung von Carbonaten bzw. Bicarbonaten aus den Salzen von in der Milch vorhandenen organischen Säuren durch Oxydation. Hier kommt vermutlich in erster Linie die Citronensäure in Betracht und auf diese Weise erklärt sich auch das schlechte Wachstum aller Stämme in Milch. In der Tabelle XV ist der Stand der H-Ionenkonzentration nach 9 Tagen angegeben, die Alkalisierung macht sich bei den schnell wachsenden Stämmen (8, 21) aber schon früher geltend, die langsam wachsenden (Stamm 15) zeigen sie erst nach längerer Zeit, auch erreichen nicht alle den gleichen Grad der Alkalität. Ebenso setzt die Veränderung der Milch nicht überall nach der gleichen Kulturzeit ein.

Zusammenfassung.

Es wurden 27 Stämme von *Mycobakterien* und *Proactinomyceten* untersucht und ihre Zugehörigkeit zu den verschiedenen Arten und Modifikationen festgestellt.

Die meisten Organismen sind streng aerob, drei Stämme zeigten auch unter anaeroben Bedingungen ein sehr schwaches Wachstum, doch war die Farbstoffbildung vollständig unterdrückt.

Die Pigmentbildung trat in belichteten und unbelichteten Kulturen auf, ihre Intensität war in Tageslichtkulturen aber größer. In einigen Stämmen wurde Carotin nachgewiesen.

Die Untersuchungen zur Morphologie fanden ausschließlich an Einzellkulturen statt. Die Stämme 1 bis 7 (*Myc. lacticola*) zeigen in jungen Kulturen nie Verzweigungen, bei einigen von ihnen wurde sie in alten beobachtet. Das gleiche gilt für Stamm 14 (*Myc. luteum*). Die Stämme 15 bis 20 (*Myc. eos*) waren nie verzweigt, im Alter sind sie kokkoid. Die Stämme 8 bis 13 (*Myc. phlei*) bilden in sehr jungen Kulturen Verzweigungen, die am dritten Kulturtag verschwunden sind, alte Kulturen enthalten nur kokkoide Formen. Die *Proactinomyceten* bilden in der Jugend ein kleines verzweigtes Mycel, das am sechsten bis siebenten Kulturtag in Stäbchen und später in Kokken zerfällt.

Luftsporen wurden nie gebildet. Bei einem Stamm fanden sich Dauerformen anderer Art, deren Auskeimung beobachtet wurde.

Die Säurefestigkeit ist abhängig von verschiedenen äußeren Bedingungen, für ihren Grad ist nur die H-Ionenkonzentration der Säure nicht ihre *Art* verantwortlich. Die durch festgebundene Lipoidsubstanzen beeinflußte Struktur des Plasmas wurde als Ursache der Säureresistenz wahrscheinlich gemacht.

Der Anteil der Lipoidsubstanzen in % des Trockengewichts der Bakterien und der Prozentsatz des Unverseifbaren wurde für einige Stämme bestimmt.

In ultraviolettem Licht zeigten alle Organismen mehr oder weniger starke Fluoreszenz.

Die spezifische Wirkung des Glycerins im Nährboden wurde auch für die *Lacticola*-Stämme nachgewiesen, die dabei gebildete Säure wurde als Milchsäure identifiziert.

In synthetischen Nährlösungen tat $(NH_4)_2HPO_4$ als Stickstoffquelle die besten Dienste.

Unter den Kohlenhydraten wurde Raffinose nur von wenigen, Stärke von keinem Stamm ausgenutzt. Von organischen Säuren erwies sich die Citronensäure als schlechte C-Quelle, die Aminosäuren wurden allgemein gut verwertet.

Milch ist für die *Mycobakterien* ein schlechter Nährboden, sie wird nicht koaguliert und nicht peptonisiert.

Literatur.

Anderson, R. I., J. of biol. Chem. **74**, 525, 1927. — *Auclair, I.*, u. *L. Paris*, Arch. med. exper. et anat. **20**, 737, 1908.

Barbudieri, C., Centralbl. f. Bakt. I Orig. **146**, 377, 1941. — *Baudran, G.*, C. r. Acad. Sci. **152**, 657, 1906. — *Bergey, D. H.*, Man. of derterm. Bact., 5. Aufl. London 1939. — *Bernhauer, K.*, Gärungschem. Praktikum. Berlin

Springer, 1936. — *Bienstock, B.*, Fortschr. d. Med. **4**, 193, 1886. — *Bullock, W.*, u. *J. J. R. Mc. Leod*, J. of hyg. **4**, 1, 1904. — *Büttner, H.*, Arch. Hyg. **17**, 12, 1926. — *Braun, H.*, *H. Stamatelakis* u. *S. Kondo*, Biochem. Zeitschr. **145**, 381, 1924. — *Braun, H.*, u. *G. Vasarhelyi*, Centralbl. f. Bakt. I. Orig. **127**, 105, 1933. — *Brockmann, H.*, Angew. Chem. **53**, 384, 1940. — *Brockmann H.*, u. *H. Schodder*, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **74**, 73, 1941. — *Bruns, H.*, Centralbl. f. Bakt. I, **17**, 817, 1895.

Chargaff, E., *M. Pangborn* u. *R. J. Anderson*, J. of biol. Chem. **90**, 45, 1931. — *Carter, J. M.*, u. *E. G. Hastings*, J. Bact. **29**, 503, 1935. — *Coghill, R. D.*, u. *O. D. Bird*, J. of biol. Chem. **81**, 115, 1929. — *Coppen, Jones A.*, Centralbl. f. Bakt. **1**, 17, 1895. — *Cutinelli, C.*, Boll. Ist. sier. milan. **19**, 146, 1940; Ref. Centralbl. f. Bakt. I, **138**, 192, 1940.

Danilow, A. N., Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **48**, 27, 1924.

Ebeling, R., diese Zeitschr. **9**, 1, 1938. — *Ebina, T.*, Centralbl. f. Bakt. I. Orig., **145**, 289, 1940. — *Eichbaum, F.*, Zeitschr. f. Immunforsch. **74**, 31, 1932.

Fortner, J. D., Naturwiss. **23**, 699, 1935. — *Franke, W.*, u. *W. Peris*, Biochem. Zeitschr. **295**, 61, 1938. — *Fernbach, E.*, u. *G. Rullier*, C. r. soc. Biol. **131**, 1142, 1939. — *Finke, L.*, Arch. Hyg. **123**, 381, 1940. — *Fontés, R.*, Beitr. z. Klin. d. Tub. **77**, 2, 1931. — *Frei, W.*, u. *N. Pockschischewsky*, Centralbl. f. Bakt. I. Orig., **60**, 161, 1911. — *Frey, C.*, u. *W. A. Hagan*, J. Inf. Dis. **49**, 497, 1931.

Gardner, A. D., J. Path. Bact. **32**, 715, 1929. — *Gildemeister, E.*, Centralbl. f. Bakt. I. Orig., **86**, 513, 1921. — *Gottstein, A.*, Fortschr. d. Med. **4**, 252, 1886. — *Gordon, R. E.*, J. Bact. **34**, 617, 1937. — *Gordon, R. E.*, u. *W. A. Hagan*, ebenda **36**, 39, 1938. — *Goris, A.*, C. r. Acad. Sci. **170**, 1525, 1920. — *Grassberger, R.*, Münch. med. Wochenschr. **46**, 343, 1899. — *Gray, P. H. H.*, u. *H. G. Thornton*, Centralbl. f. Bakt. II, **73**, 74, 1928. — *Gróh, E.*, ebenda I. Orig., **128**, 353, 1933.

Haag, F. E., Centralbl. f. Bakt. II, **71**, 1, 1927. — *Hagemann, K. H.* Münch. med. Wochenschr. **84**, 76, 1937. — *Derselbe*, ebenda **85**, 1066, 1938. — *Derselbe*, Deutsch. med. Wochenschr. **63**, 517, 1937. — *Hammerschlag, A.*, Sitzungsber. d. kais. Acad. d. Wiss., 13. Dez. 1888. — *Hefferan, M.*, Centralbl. f. Bakt. II, **11**, 460, 1903. — *Heide, S.*, diese Zeitschr. **10**, 135, 1939. — *Herrmann, A.*, Deutsch. med. Wochenschr. **64**, 1354, 1938. — *Hill, H. W.*, J. med. Res. **7**, 115, 1902. — *Holmes, H. N.*, J. of biol. Chem. **99**, 417, 1933. — *Hu, K.*, Japan. J. of exper. Med. **14**, 29, 59, 67, 1936.

Jensen, H. L., Proc. Lin. Soc. NSW **59**, 18, 1934. — *Derselbe*, ebenda **56**, 79 u. 345, 1931. — *Derselbe*, ebenda **56**, 201, 1932.

Kahn, Morton, C. Am. Rev. Tub. **20**, 19, 1929. — *Derselbe*, Ann. Inst. Past. **44**, 259, 1930. — *Keudel, A. J.*, *A. A. Day* u. *A. W. Walker*, J. Inf. Dis. **15**, 417, 428, 1914. — *Kersten, H. E.*, Centralbl. f. Bakt. I. Orig., **51**, 494, 1909. — *Kirchner, C.*, ebenda I. Orig., **118**, 167, 1930. — *Klebs, E.*, ebenda I, **20**, 488, 1896. — *Klein, F.*, Handb. d. Pflanzenanalyse, Spez. Anal. I, S. 630. Berlin, Springer, 1932. — *Derselbe*, Spez. Anal. III, S. 426. — *Koch, R.*, Mitt. d. kaiserl. Gesundheitsamtes **2**, 1, 1884. — *Kuhn, P.*, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. **74**, 93, 1932. — *Kunz, O.*, Centralbl. f. Bakt. I. Orig., **147**, 206, 1941. — *Krassilnikow, N. A.*, C. r. del'Acad. d. Sci. d. l'URSS. **2**, 580, 1934. — *Derselbe*, Bull. Acad. Sc. URSS. Sér. biol. **1**, 51, 1938 — *Derselbe*, Centralbl. f. Bakt. II, **90**, 428, 1934. — *Kresling, K.*, ebenda I, **30**, 897, 1901. — *Kriss, A. E.*, u. *A. Koreniako*, J. Microbiol. **8**, 522 u. 693, 1939.

Lange, Br., Ber. d. Rob. Koch-Stift. **8**, 134, 1921. — *Lange, L.*, Centralbl. f. Bakt. I. Orig., **127**, 10, 1933. — *Lehmann-Neumann*, Bakteriologie, 7. Aufl. München 1927. — *Lembke, A.*, u. *H. Ruska*, Klin. Wochenschr. **19**, 217, 1940. — *Lom'nski, J.*, Centralbl. f. Bakt. I. Orig., **128**, 276, 1933. — *Long, E. R.*, Amer. Rev. Tub. **6**, 642, 1922/23. — *Long, E. R.*, u. *L. K. Campbell*, ebenda **6**, 636, 1922/23. — *Long, E. R.*, u. *A. L. Major*, ebenda **5**, 1921/22.

Maaßen, A., Arb. d. kaiserl. Gesundheitsamtes **12**, 340, 1895. *Maffuci, A.*, Zeitschr. f. Hyg. **2**, 445, 1892. — *Marmorek, K.*, Zeitschr. f. Tub. **1**, 144, 1901. — *Merrill, H. M.*, J. Bact. **20**, 235, 1930. — *Metschnikoff, E.*, Virchows Arch. **16**, 177, 1888. — *Moeller, A.*, Deutsch. med. Wochenschrift **24**, 376, 1898. — *Derselbe*, Therap. Monatsh. **12**, 607, 1898. — *Molisch, H.*, Mikrochem. d. Pflanzen, 2. Aufl., S. 250. Jena, G. Fischer, 1921. — *Much, H.*, Beitr. Klin. Tub. **8**, 85 u. 375, 1907.

Oerskow, J., Centralbl. f. Bakt. I. Orig., **128**, 271, 1932. — *Derselbe*, C. r. Soc. Biol. **45**, 1115, 1926. — *Derselbe*, Invest. into the morphol. ray fungi. Copenhagen, Levin u. Munksgaard 1923.

Pfannenstiel, W., Zeitschr. f Hyg. u. Infektionskrankh. **95**, 87, 1922. — *Piekarski, G.*, diese Zeitschr. **11**, 406, 1940. — *Pla y Armengol, J.*, Beitr. Klin. Tub. **77**, 47, 1931. — *Plotho. O. von* diese Zeitschr. **11**, 33, 1940.

Quastel, J. H., u. *B. J. Wooldridge*, Biochem. J. **19**, 652, 1925. — *Derselbe*, Ergebn. d. Enzymforsch. **1**, 208, 1932.

Rabinowitsch, L., Zeitschr. f. Hyg. **26**, 102, 1897. — *Rippel, A.*, *K. Nabel* u. *W. Köhler*, diese Zeitschr. **12**, 285, 1941. — *Ruppel, W. G.*, Zeitschr. f. phys. Chem. **26**, 218, 1898.

Schloßberger, H., Beitr. Klin. Tub. **50**, 216, 1921. — *Schneider-Zimmermann*, B·t. Mikrotechnik, 2. Aufl., S. 400. Jena, G. Fischer, 1922. — *Seifert, O.*, u. *Fr. Müller*, Fr. Tschb. med. klin. Diagnost., S. 127. Wiesbaden, Bergmann, 1915. — *Smith, Graham, H. S.*, Parasitology **3**, 17, 1910. — *Smith, T.*, J. med. Res. **13**, 253, 1905. — *Söhngen, N. L.*, Centralbl. f. Bakt. II, **37**, 599, 1913. — *Sonderhoff, R.*, u. *H. Deffner*, Liebigs Ann. **525**, 132, 1936. — *Sordelli, A.*, u. *A. Arena*, C. r. Soc. Biol. **67**, 63, 1934. — *Spengler, C.*, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **49**, 541, 1905. — *Stapp, C.*, u. *H. Bortels*, Zeitschr. f. Parasitenkde. **4**, 15, 1931.

Tamura, S., Zeitschr. f. phys. Chem. **87**, 85, 1913. — *Thomson, L. C.*, Amer. Rev. Tub. **26**, 162, 1932.

Vierling, K., Centralbl. f. Bakt. II, **52**, 193, 1921.

Weinzirl, J., u. *F. Knapton*, Amer. Rev. Tub. **15**, 380, 1927. — *Winslow, C. E. A.*, *J. Broadhurst*, *R. E. Buchanan*, *C. Krumwiedel*, *L. A. Rogers* u. *G. H. Smith*, J. Bact. **5**, 199, 1920. — *Wyckoff, R. W. Wg.*, J. Exper. Med. **59**, 381, 1934. — *Derselbe*, Amer. Rev. Tub. **29**, 389, 1934. — *Wyckhoff, R. W. Wg.*, u. *K. C. Smithburn*, J. Inf. Dis. **52/53**, 201, 1933.

Zechmeister, L., u. *L. von Cholnoky*, D. chromat. Absorptionsmeth., 2. Aufl. Berlin, Springer, 1938.

(Aus dem Institut für Biochemie und Nahrungsmittelchemie der Deutschen Technischen Hochschule in Prag, Mikrobiologische Abteilung.)

Ernährungsphysiologische Untersuchungen an Fusarien, unter Hervorhebung der Ölspeicherung.

Von

A. Niethammer.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 22. August 1942.)

Aus verschiedenen Erdproben sowie von cellulosehaltigem Materia isolierten wir mannigfache *Fusarium*-Arten. Einzelne derselben dienten zu ernährungsphysiologischen Untersuchungen. Den ersten Anlaß zu den Untersuchungen bildeten Beobachtungen über das ganz unterschiedliche Wachstumsbild auf verschiedenen Nährböden. Die Konidienbildung, welche für die Artbestimmung unerläßlich ist, hängt sehr stark von der Wahl des Nährmediums ab. Auf vielen Substraten gelingt sie trotz langer Kulturdauer überhaupt nicht. Unsere Untersuchungen sollen darüber Auskunft geben, welche Nährböden beste Entwicklung bei deutlicher Konidienbildung gewähren und somit auch die günstige Möglichkeit für die Bestimmung. Besonderes Augenmerk wurde auf verschiedene cellulosehaltige Abfallstoffe als Nährsubstrat gerichtet, da solchen Untersuchungen auch in Hinblick auf die Erzeugung fett- und eiweißhaltiger Futtermittel Bedeutung zukommen kann. Die oft sehr starke Speicherung von Öltropfen in Hyphen, Konidien sowie Chlamydosporen fiel dabei auf, sie wurde genauer verfolgt und den ihr zugrunde liegenden Ursachen nachgegangen. Auf die Erfahrungen von *Haeseler*, *Fink*, *Heide*, *Raaf*, *Blinc-Bojic* ist hinzuweisen.

Bei der Bestimmung der Arten bin ich der Hilfe von Oberregierungsrat *Wollenweber*, Berlin, teilhaftig gewesen.

Folgende Nährsubstrate, die mit Nummern bezeichnet sind, dienten zu den Untersuchungen: 1. Kartoffelstücke, sauber gereinigt. 2. Kartoffelsaftagar nach *Wollenweber*. 1000 ccm Flüssigkeit, bestehend aus 600 ccm Wasser und 400 ccm Kartoffelsaft (aus rohen Kartoffeln). 15 Minuten bei 1 Atm. Überdruck im Autoklaven sterilisieren. 20 g Agar-Agar, 10 g Traubenzucker dazu. $p_H = 4{,}8$ bis 5, das Ansäuern erfolgt mit Milchsäure. 3. Bierwürze-Agar. Ungehopfte Bierwürze von 4^0 Ball. mit 1,5% Agar-Agar versehen. 4. Maismehlagar. 1000 ccm Wasser, 30 g Maismehl (vorher mit wenig Wasser anrühren), 20 g Agar-Agar, 5 ccm Glycerin. Nach dem Auflösen 0,5 ccm Milchsäure zusetzen. 5. Chinasäureagar. 2 g Chinasäure, 0,1 ccm 20%iger NH_3-Lösung, 0,03 g KH_2PO_4, 0,15 g $MgSO_4$, 0,003 g, $FeCl_3$. Mit Na_2CO_3 neutralisieren. 2% Agar-Agar dazu. 6. Streifen von Sulfitcellulose mit folgender mineralischen Nährlösung angefeuchtet:

0,5% $(NH_4)_2SO_4$, 0,1% KH_2PO_4, 0,1% $MgSO_4 \cdot p_H = 6,5$ mit H_2SO_4 eingestellt. 7. Ausgelaugte Rübenschnitzel mit Leitungswasser angefeuchtet. 8. Abfallstoffe, wie Haferspelzen, Bohnen-, Pferdebohnen- und Erbsenstroh, Kartoffelkraut. 9. Zuckerlösungen zur Verfolgung der Bildung von Öltropfen in den Hyphen. Ihre Zusammensetzung erfolgt nach den Erfahrungen von *Heide*. 7,5% Saccharose, 0,5% KH_2PO_4, 0,25% $MgSO_4$, 1% Asparagin. Die Asparaginmenge wird in den Versuchen variiert, und zwar vermindert. Eine parallele Serie wird mit $(NH_4)_2SO_4$ als N-Quelle angesetzt. 10. Das Gärvermögen gegenüber 5%igen Lösungen von Maltose Saccharose, Lävulose und Lactose wird studiert. Ein Zusatz von 0,05% Pepton, je 0,01% KH_2PO_4 und $MgSO_4$ wird gereicht.

Es folgen die Beobachtungen an den einzelnen Fusarien. Die Versuche wurden bei 23 bis 25° im Dunkeln ausgeführt[1].

F. sambucinum Fuck.

Herkunft: Erdreich unter einem Roggenfeld, Haid im Sudetenland. Diese Form wurde auch von *Hochapfel* untersucht. Temperaturoptimum 20 bis 23°. Die meisten Zuckerarten können verwertet werden. Bei älteren Kulturen wird auf das Stadium einer fettigen Degeneration hingewiesen.

Bericht über die einzelnen Nährmedien.

1. Sehr dichte Mycelentwicklung, weiß; himbeerfarbene sowie gelbe Farbentöne treten erst nach etwa 10 Tagen auf. Konidienbildung unterbleibt, ebenso die von Chlamydosporen. In den Hyphen nach 10 bis 12 Tagen deutliche Ablagerung von hellen Öltropfen. Mit Sudan III tritt hier, wie in den später angeführten Fällen, rasch Rotfärbung ein. Osmiumsäure bedingt Schwärzung.

2. Dichtes weißes Mycel, himbeerfarbene und gelbe Einlagerungen erscheinen nach 8 bis 10 Tagen. Diese Verfärbungen treten verschieden ein, einmal herrschen die roten, das andere Mal die braunen Töne vor. Konidienbildung fehlt. Ablagerung von Öltropfen wie bei 1.

3. Entspricht 2.

4. Die roten bzw. braunen Farbentöne sind hier besonders deutlich. Konidienbildung im Substratmycel. Die Ablagerung von Öltropfen in den Hyphen ist schwach.

5. Weißes, einsinkendes Mycel; das Substrat erleidet eine braune Verfärbung. In dem eingesenkten Mycel typische Konidienbildung. Chlamydosporenbildung in Paketen. In Hyphen, Konidien sowie Chlamydosporen deutliche Ablagerung von Öltropfen.

6. Deutliche bis schwache Mycellager; typisch eingesenkt in das Substrat. Konidienbildung; große, gelbliche Chlamydosporen. Innerhalb von 14 Tagen deutliche Ablagerung von Öltropfen in den Hyphen.

[1] In Einteilung und Wahl der Ausdrücke beziehe ich mich auf *Wollenweber-Reinking*.

7. Dichtes weißes Mycel mit rotgelben Einlagerungen; starke Absonderung von Öltropfen in den Hyphen. Die Konidienbildung ist sehr schwach.

8. Haferspelzen weisen nach wenigen Tagen dichte weiße bis rosa Lager auf. Konidienbildung sowie Absonderung von Chlamydosporen reichlich. In allen Teilen sind reichlich Öltropfen zu erkennen. Die gleichen Befunde sind an Bohnen-, Pferdebohnen- und Erbsenstroh sowie Kartoffelkraut ermittelt.

9. 0,25 % Asparaginzusatz genügt zur Entwicklung einer Myceldecke und starkem submersem Mycel mit sehr häutiger Ablagerung von Öltropfen, vor allem in den submersen Teilen. $(NH_4)_2SO_4$ wirkt kaum schlechter.

10. Wachstum auf allen vier Zuckerarten; deutlich vergoren wurden nur Maltose und Saccharose (vgl. *Nord*). Hier wurde zusätzlich das Wachstum auf verdünnter Sulfitablauge (Fichtenzellstoff) verfolgt. Es erfolgt submers in großen Ballen, in den Hyphen Ablagerung großer Öltropfen. Die Sulfitablauge mit etwa 2 % Fehling reduzierenden Stoffen wurde auf 5 Teile mit 95 Teilen Wasser verdünnt.

F. bulbigenum Cke-Mass.

Herkunft: Erdreich unter Johannisbeersträuchern bei Prag.

Bericht über die einzelnen Nährböden.

1. Mittelmäßige, weiße Mycelentwicklung. In den Hyphen ist nach wenigen Tagen starke Absonderung von Öltropfen zu verzeichnen. Nur Mikrokonidien.

2. Entspricht 1.

3. Weißwollige Lager; nach 2 bis 3 Wochen langer Kulturdauer Einmengung von lila Farbentönen. Keine Konidien. In den Hyphen dichte Ablagerung von Öltropfen.

4. Entwicklung schwach. Keine Konidienbildung. Die Ablagerung von Öltropfen in den Hyphen ist spärlich.

5. Dunkle, eingesenkte Lager, Substrat schwarz, kein Luftmycel. In diesem eingesenkten Mycel Absonderung von derben Makrokonidien und von großen Öltropfen in den Hyphen.

6. Entwicklung oberflächlich kaum sichtbar; Hyphen in das Substrat eingesenkt. Die Ablagerung von Öltropfen in den Hyphen ist außerordentlich stark (Abb. 1). Bildung von großen, derben Konidien im Substrat.

7. Starke, dichte Mycelentwicklung; zunächst weißwollig, später deutlich eingestreute lila Farbentöne. Nur Mikrokonidienbildung. Im

Luftmycel weniger, vorwiegend im Stroma in den recht breiten Hyphen Ablagerung von zahlreichen Öltropfen.

8. Haferspelzen lassen keine sehr starke Entwicklung zu. Die Konidienbildung ist gut. In den stark verbreiterten Hyphen ist eine sehr reichliche Ablagerung von Öltropfen. Die Tropfen sind hier besonders groß. Auf Bohnen-, Pferdebohnen- und Erbsenstroh sowie Kartoffelkraut ist das Wachstumsbild ähnlich.

9. Bei einer Asparaginmenge von 0,25 % ist Wachstum sowie Ablagerung von Öltropfen in den Hyphen sehr gut. $(NH_4)_2SO_4$ erweist sich hier als beinahe ebenso gut.

10. Die vier Zuckerarten ermöglichen Wachstum, deutlich vergoren werden Saccharose und Maltose.

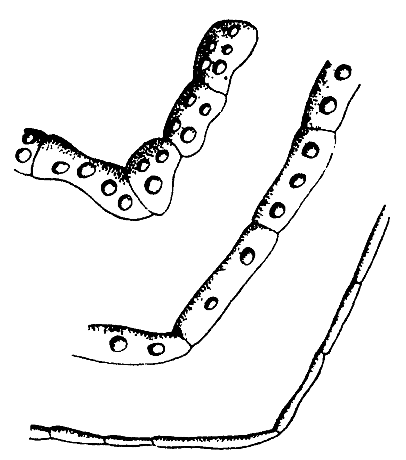


Abb. 1. Fusarium bulbigenum. Schmale Hyphen, daneben derbe Hyphen mit großen Öltropfen. Substrat, Cellulosestreifen. Vergrößerung 650fach.

F. oxysporum Schlechtendahl.

Herkunft: Erbsenfeld, Erdreich, unweit Prags.

Bericht über die einzelnen Nährböden.

1. Weißwolliges Luftmycel, Substrat braun verfärbt. Makrokonidien mit großen Fetteinschlüssen. In den Hyphen erscheinen nach 4 Tagen große Öltropfen.

2. Entspricht 1.

3. Langfaseriges Luftmycel, weiß bis rosa. Stroma braun, nach 2 bis 3 Wochen langer Kulturdauer sind lila Verfärbungen zu verzeichnen. Keine Konidien. In den Hyphen viel Öltropfen.

4. Entspricht 3.

5. Luftmycel, dünn, weiß. Stroma leicht braun. Substrat blaulila verfärbt. Keine Konidienbildung. Sehr große Öltropfen in den Hyphen.

6. Oberflächliches, weißes Mycel; bald treten im Substrat lila Verfärbungen auf. Im Mycel zunächst terminale und intercalare Chlamydosporen. Nach etwa 3 Wochen erscheinen auf dem Substrat gelbrote Sklerotien, welche zahlreiche typische Makrokonidien enthalten. In den Hyphen starke Ablagerung von Öltropfen.

7. Sehr mächtige Mycelentwicklung, weiße Farbentöne. Makrokonidien von Fett erfüllt. In den Hyphen sehr reichliche Ablagerung von Öltropfen.

8. Auf Haferspelzen weißliche Decken. Makro-Mikrokonidien sowie Chlamydosporen. In den Hyphen sehr viele Öltropfen. Bohnen-, Erbsen- Pferdebohnenstroh sowie Kartoffelkraut zeigen dasselbe Ergebnis.

9. Vorwiegend submerses Wachstum, nur geringe Deckenbildung. 0,25 %iger Zusatz von Asparagin bedingt die stärkste Absonderung von Öltropfen bei gutem Wachstum.

10. Die vier Zuckerarten ermöglichen Wachstum. Saccharose und Maltose werden vergoren.

Ein Stamm aus dem Moor Soos bei Franzensbad sowie zwei Stämme aus dem Erdreich unter einem Flachsfeld bzw. Roggenfeld bei Haid (Sudetenland) zeigen das gleiche Ergebnis.

F. oxysporum Schl. var. aurantiacum (Lke. ut sp.) Wr.

Herkunft: Kohlfeld bei Moderschan-Prag.

Bericht über die einzelnen Nährböden.

1. Weißes Luftmycel, Stroma braun. Makro- und Mikrokonidien. Nach wenigen Tagen starke Absonderung von Öltropfen in den Hyphen und Konidien.

2. Ähnliche Ausbildung.

3. Zunächst weiße, dann rosarote Mycellager. Stroma rosa. Keine Konidien. Starke Ablagerung von Öltropfen in den Hyphen.

4. Weißes bis rosa Luftmycel. Stroma braun. Reichliche Bildung von Makrokonidien, die viel Fett speichern. In den Hyphen ebenfalls reiche Ablagerung von Öltropfen.

5. Luftmycel weiß; eingesenktes braunes bis schwarzes Stroma, hier in den Hyphen sehr mächtige Ablagerung von Öltropfen. Reichlich Absonderung von Konidien mit Öleinschlüssen. Bildung von Chlamydosporen mit gezacktem Rande und einem großen Öltropfen.

6. Weißwollige Lager, welche leicht einsinken und das Substrat allmählich viskos machen. Konidienbildung sehr reichlich. Nach 3 Wochen entstehen auf dem Substrat gelbrote, stecknadelkopfgroße Sklerotien, welche sehr reichlich Konidien enthalten. Nach 6 Wochen sind die Streifen rosa verfärbt und deutlich erweicht. Öltropfen in den Hyphen.

7. Sehr dichte weiße Lager. Bildung von Mikrokonidien. Starke Absonderung von großen, hellen Öltropfen in den Hyphen.

8. Auf Haferspelzen Deckenbildung; viel Makrokonidien. In den Hyphen große, helle Öltropfen. Erbsen-, Bohnen-, Pferdebohnenstroh sowie Kartoffelkraut zeigen ebenfalls dichte Mycellager mit kräftigen Öleinschlüssen in den Hyphen. Bei Kartoffelkraut ist die Entwicklung ganz besonders stark und die Ölablagerung sehr beträchtlich.

9. Ein Zusatz von 0,125 % Asparagin bewährt sich für Wachstum und Ablagerung von Öltropfen ganz besonders. Die Mycelbildung hier ist schwammig bis submers. Höhere Gaben von Asparagin sind nicht besser. Eine gleich starke Gabe von $(NH_4)_2SO_4$ wirkt ähnlich.

10. Wachstum ist auf allen Zuckerarten möglich, Saccharose wird stark, Maltose und Lävulose deutlich vergoren.

F. bulbigenum Cke et Mass. var. blasticola (Rostr. ut sp.).

Herkunft: Walderde im oberen Egertal. Sudeten.

Bericht über die einzelnen Nährböden.

1. Dichte weiße Lager; Stroma bräunlich. Nur Mikrokonidien In den Hyphen deutliche Ablagerung von Öltropfen.

2. Wie 1; aber Bildung typischer Makrokonidien, ebenso Chlamydosporen, daneben auch Mikrokonidien. In allen Teilen starke Ablagerung heller Öltröpfchen.

3. Weißes, wolliges Luftmycel mit roten und lila fädigen Einlagerungen. Stroma rot bis blau verfärbt. Reichliche Bildung von Makrokonidien, daneben Mikrokonidien. Die Fettspeicherung ist vor allem in den Hyphen des Stromas sehr kräftig.

4. Farbentöne und Mycel wie bei 3, aber etwas schwächer. Konidienbildung fehlt.

5. Eingesenktes Mycel, kein Luftmycel; deutliche Bildung beider Arten von Konidien. In den Hyphen sind reichlich Öltropfen abgelagert.

6. Die Entwicklung auf Cellulose ist auffallend gering. Keine Konidienbildung. Die eingesenkten Hyphen sind aufgetrieben und führen sehr große, oft gelb verfärbte Öltropfen.

7. Die Entwicklung ist sehr gut; weißwollig, untermischt mit lila Tönungen. Konidienbildung unterbleibt. Die Ablagerung von Öltropfen in den Hyphen ist sehr beträchtlich.

8. Das Wachstum auf Haferspelzen ist gering; die Ablagerung von Öltropfen in den Hyphen ist ungewöhnlich kräftig. Konidienbildung unterbleibt. Die gleichen Befunde gelten für Erbsen-, Bohnen-, Pferdebohnenstroh und Kartoffelkraut.

9. 0,25 % Asparagin ist für Mycelbildung und Absonderung reichlicher Öltropfen in den Hyphen gut; Ammonsulfat bewährt sich in der gleichen Konzentration ebenfalls.

10. Alle vier Zuckerarten lassen Wachstum zu; vergoren werden nur Maltose und Saccharose.

F. bulbigenum Cke et Mass. var. tracheiphylum (E. F. Sm.) Wr.

Herkunft: Ackerfeld Haid im Sudetenland.

Bericht über die einzelnen Nährböden.

1. Weißwollige Lager, Stroma braun. Makro- und Mikrokonidien führen bei ihrer Loslösung von den Hyphen starke Mengen von Öltropfen. Die Septen sind durch dieselben verdeckt. In den Hyphen ebenfalls starke Ablagerung von Fetttropfen.

2. Wie 1, nur ist auf die kräftige Ausbildung von Chlamydosporen mit einem großen Öltropfen hinzuweisen.

3. Weißwollige Lager leicht rosa Verfärbung von Luftmycel und Stroma. Keine Konidien. Fetttropfen in den Hyphen.

4. Weißwollige bis rosa Lager; blaurotes Stroma. Starke Bildung von Konidienköpfchen. Konidien und Hyphen sehr reich an abgelagerten Öltropfen.

5. Eingesenktes, braunes Lager, kein Luftmycel. Substrat schwarz. Konidienbildung. In allen Teilen starke Ablagerung von Öltropfen.

6. Gute Mycelentwicklung mit starker Absonderung von Konidien und Chlamydosporen. In allen Teilen viel Öltropfen abgelagert.

7. Dichte, weiße Lager mit Mikrokonidien und endständigen Chlamydosporen. Die Absonderung von Öltropfen ist sehr beträchtlich.

8. Haferspelzen werden von einem dicken Mycel bewachsen, das reichlich Konidien absondert. Die Ablagerung von Fetttropfen ist hier sehr kräftig. Kartoffelkraut ist hier desgleichen ein glänzendes Nährmedium, auf dem eine bedeutende Ablagerung von Öltropfen in den Hyphen erfolgt. Bohnen-, Erbsen- und Pferdebohnenstroh ist etwas schwächer. Auf allen diesen Substraten ist kräftige Konidienbildung.

9. Auf der Zuckerlösung ist die Entwicklung hier besonders gut; 0,125 % Asparaginzusatz bedingt eine ganz mächtige Ablagerung von Öltropfen. Das Wachstum erfolgt submers. Ammonsulfat 0,25 % ist ebenfalls eine gute Stickstoffquelle

10. Wachstum tritt an allen Zuckerlösungen ein; auf Saccharose und Lactose ist dieses am besten. Vergoren werden nur Saccharose kräftig, Lävulose schwach und die anderen gar nicht.

F. solani (Mart.) App. et Wr.

Herkunft: Haferfeld bei Prag.

Bericht über die einzelnen Nährböden.

1. Dichte, weiße Lager, Stroma braun. Keine Konidienbildung. In den Hyphen starke Ablagerung von Öltropfen.

2. Entspricht 1.

3. Weißes Mycel mit rötlichen Einlagerungen. Stroma braun. Keine Konidienbildung. Geringe Absonderung von Öltropfen.

4. Mycel eingesenkt, weiß, rosa Verfärbungen. Chlamydosporen. Große Öltropfen in den Hyphen.

5. Eingesenkt, Mycel gelblich, kein Luftmycel. Substrat schwarz. Keine Konidienbildung. Starke Ablagerung von Öltropfen in den Hyphen.

6. Weißwollige Decke. Substrat wird erweicht, rosa verfärbt. In diesem Schleim werden reichlich Makro- und Mikrokonidien abgelagert. In den Hyphen reichlich Öltropfen.

7. Üppige, helle Mycelentwicklung; im Laufe von einigen Wochen tritt lila Verfärbung ein. Nur Mikrokonidien. In den Hyphen große und zahlreiche Fetttropfen.

8. Haferspelzen weiße Decke, Konidienbildung. Reichliche Ablagerung von Öltropfen in den Hyphen. Ähnliche Ergebnisse liegen für Bohnen-, Erbsenstroh sowie Kartoffelkraut vor.

9. In der Zuckerlösung submerses Wachstum und sehr starke Ablagerung von Öltropfen. 0,25 % Asparagin ist die beste Konzentration. Ammonsulfat ist hier etwas ungünstiger.

10. Wachstum auf allen Zuckerlösungen; vergoren werden Saccharose und Maltose.

F. solani (Mart.) var. Martii (App. et Wr. sub. specie) Wr.

Herkunft: Erdreich unter Johannisbeersträuchern bei Prag.

Bericht über die einzelnen Nährböden.

1. Weiße Decken, Stroma grünlich verfärbt. Derbe Konidien, dicht von Öltropfen erfüllt, keine Septen sichtbar. In den Hyphen Ablagerung von Öltropfen.

2. Entspricht 1.

3. Luftmycel schwach entwickelt, weiß, einsinkend; Stroma grün verfärbt. Die Ablagerung von Öltropfen in den Hyphen ist gering. Keine Konidienbildung.

4. Ähnlich wie 3.

5. Dunkle, eingesenkte Lager, Substrat schwarz verfärbt. Hier in den Hyphen deutliche Ablagerung von Öltropfen. Keine Konidienbildung.

6. Schwache Mycelausbildung, in das Substrat eindringend, dieses erweichend. Keine Verfärbungen. Makrokonidienbildung. In den Hyphen große Öltropfen.

7. Sehr üppige Entwicklung, keine Verfärbung. Die Hyphen sind teils verbreitert und lassen große Öltropfen erkennen. Bildung sehr derber Konidien mit kräftigen Fetteinschlüssen. Die Septen sind nicht sichtbar.

8. Haferspelzen gestatten nur geringe Entwicklung. Die Fettspeicherung in den Hyphen ist deutlich. Zunächst keine Konidienbildung; nach einigen Tagen entstehen Sklerotien mit dichten Konidieneinschlüssen. Die Septen sind deutlich sichtbar, keine Fetteinschlüsse. Auf Bohnen- und Erbsenstroh, ferner Kartoffelkraut ist die Entwicklung ähnlich wie bei Haferspelzen.

9. Die Zuckerlösung bedingt submerses Wachstum; hier ist in den Hyphen sehr viel Öl abgelagert. 0,25 % Asparagin ist die beste Konzentrationsstufe. Ammonsulfat bewährt sich schlechter.

10. Wachstum auf alten Zuckerlösungen ist möglich. Vergoren werden Maltose und Saccharose.

Unsere Versuche auf zahlreichen Nährböden zeigen, daß Wachstumsbild und Wachstumsart je nach denselben sehr verschieden sind. Gutes Wachstum und deutliche Konidienbildung zeigen sich vorwiegend auf natürlichen Substraten. *A. R. Werner* gibt bei Untersuchungen an russischen Böden an, daß sich im Boden selbst diese Mikroorganismen schlecht halten, sie werden meist ein Raub der *Bakterien* und *Protozoen*. Anders liegt nach diesem Forscher die Sache, wo im Boden viele organische Reste oder Pflanzenbestandteile sind; hier ist üppige Entwicklung der Fusarien.

Alle von uns geprüften Fusarien können auf den mannigfachen Nährsubstraten in ihren Hyphen Öltropfen abscheiden. Im submersen Mycel oder Stroma ist diese Absonderung besonders stark. Die verschiedenen Abfallstoffe sind sehr geeignet für die Abscheidung von Öl in den Hyphen dieser Pilzgattung Am stärksten ist die Speicherung von Öl in den flüssigen Medien; hier erfolgt allerdings ein geringeres Wachstum als auf den festen Substraten. Besonders stark ist hier die Ölbildung in den submers gedeihenden Mycelpaketen. Vielfach ist überhaupt dort, wo das Wachstum irgendwie gehemmt erscheint, die Ölabsonderung besonders intensiv.

Blinc-Bojic machen auf die Ölabsonderung bei *Mucor mucedo* aufmerksam. Nach unseren Erfahrungen sondern auch andere *Mucor-*

Arten, so beispielsweise *M. silvaticus*, viel Fett ab. Am kräftigsten erfolgt die Fettabscheidung im gemeinsamen Wachstum mit einem der von uns isolierten *Fusarium*-Arten, die auch im Erdreich gemeinsam beheimatet sind.

Bei der Aufzählung von sogenannten Fettpilzen (vgl. *Haeseler-Fink*) sind künftig auch die *Fusarium*-Arten zu nennen.

Zusammenfassung.

Verschiedene Nährsubstrate werden bezüglich ihrer Eignung für Wachstum und Konidienbildung bei *Fusarium*-Arten geprüft. Natürliche, cellulosehaltige Abfallstoffe sind sehr geeignet. Auf allen geprüften Nährmedien ist auf eine starke Öltropfenablagerung in den Hyphen, vielfach auch Konidien und Chlamydosporen, hinzuweisen.

Ausgeführt mit Unterstützung des Forschungsdienstes.

Literatur.

Blinc, M., u. *M. Bojic*, diese Zeitschr. **12**, 41, 1941. — *Haeseler-Fink, F.*, Zeitschr. f. Spiritusind. **63**, 194, 1940. — *Heide, S.*, diese Zeitschr. **10**, 171, 1939. — *Hochapfel, F.*, Centralbl. f. Bakt. II, **64**, 174, 1925. — *Nord, F.*, Ergebn. d. Enzymforsch. 8, 149, 1939. — *Raaf, H.*, diese Zeitschr. **12**, 135, 1941. — *Werner, A. R.*, C. r. de l'Ac. d. Sc. de l'URSS. **4**, Nr. 1/2, 70/71, 1935.

(Aus dem Botanischen Institut der Technischen Hochschule Dresden.)

Die Entwicklung und Wandlung des Zusammenlebens von Pilzen und Algen.

Von

Friedrich Tobler.

Mit 10 Textabbildungen.

(Eingegangen am 25. August 1942.)

Die *Schwendener*sche Auffassung über die Natur der Flechten habe ich (1921) im Zusammenhang mit den heutigen Auffassungen dargestellt. Es sind dabei drei Grundtatsachen zu unterscheiden:

1. die Ähnlichkeit bzw. Übereinstimmung der Gonidien mit den Algentypen (1860),
2. der Befund, daß kein genetischer Zusammenhang zwischen Pilzen und Gonidien besteht (1868),
3. daß die Flechte, oder besser gesagt der Flechtenpilz, als Schmarotzer auf der Alge aufzufassen ist (1869).

Es sind zu *Schwendener*s Zeiten eine ganze Reihe von Einwänden seitens der Lichenologen erfolgt. *Kremplhuber* wies auf die verschiedenartige Physiologie von Pilz und Alge hin, *Körber* betonte, daß bisweilen mehrere Algentypen in einer Flechte vorkämen und *Nylander* bemerkte, daß Flechten häufig dort gedeihen, wo Algen fehlen können. Diese drei Gruppen von Einwänden sind seinerzeit wenig beachtet worden, verdienen aber eigentlich durchaus nähere Beleuchtung und sind letzten Endes Fingerzeige für *eine mehr physiologische Auffassung* der ganzen Frage. Als die Einwände erhoben wurden, ging freilich niemand näher darauf ein, und die nachfolgende weitere Arbeit bezog sich teils auf die getrennte Kultur der beiden Flechtenkomponenten, teils auf die Zusammenfügung zu neuer Symbiose (*Möller*). Man kann sagen, daß die Anatomie und der Laboratoriumsversuch mit aller Kraft die ursprüngliche, allerdings etwas naive Vorstellung der alten Lichenologie von der einheitlichen Natur der Flechte besiegen wollten und tatsächlich auch zu Fall brachten. Und *diese Sachlage ist der Grund dafür, daß die physiologische Betrachtung des Gegenstandes unnatürlich lange unterdrückt blieb.*

Wie aber ist die *Entstehung der Flechten heute vorzustellen*? Fragen wir *Schwendener*s Schriften, ja fragen wir die heutigen Lehrbücher der Botanik, so finden wir so gut wie nichts darüber und werden mehr oder weniger stillschweigend auf die Vorstellung verwiesen, daß zur Entstehung jeder Flechte ein neues Zusammentreffen der beiden not-

wendigen Komponenten auf freier Bahn notwendig sei. Erst vereinzelt sind später Hinweise auf eine andere Richtung aufgetaucht. Die starke reproduktive Fähigkeit des Pilzes betonte *Strato* (1921), die wesentliche Bedeutung der vegetativen Vermehrungsarten und den Zusammenhang mit halbfertigen Flechten habe ich selbst seit 1920 (vgl. *Tobler*, 1934) mehrfach nachgewiesen. Und so gewöhnte man sich nach und nach daran, die verschiedenartige Entwicklung und getrennte Entwicklungsmöglichkeit der beiden Komponenten in der Natur ins Auge zu fassen. Jedenfalls wäre das eine erwünscht einzuschlagende Bahn für die heutige Forschung. Mehr Beobachtung dieser Dinge in der Natur als im Laboratorium, starke Betonung der physiologischen Seite gegenüber der systematisch-morphologischen, wird uns zur Klärung noch schwebender Fragen führen. Um nur einige Beispiele bereits gesicherter Tatsachen anzuführen, sei darauf verwiesen, daß z. B. kränkelnde Algen geringere Umspinnung erfahren, sowie daß Abweichungen von der typischen Symbiose einer Flechtenart sowohl bei der Entstehung wie auch später gar nicht selten zu beobachten sind. Deutlich kann man immer wieder erkennen, daß sehr verschieden gestaltete Hyphenformen an einem Thallus vorkommen und nach der Umgebung bzw. dem Vorhandensein oder Fehlen der Gonidien an der Stelle ihres Wachstums sich zu verändern pflegen (nebenbei bemerkt ist das auch heute wohl das wertvollste Argument gegen die bisher noch nicht aufgegebene Behauptung *Elfvings*, der aus langgliedrigen Hyphen entstehende kurzgliedrige irrtümlich als Entstehung von Gonidien an Hyphen deutete). Schließlich weiß man heute, daß große regelmäßige Gruppen unvollkommener Flechten, die sich systematischer Betrachtung oder Beschreibung gänzlich entziehen können, außerordentlich reichlich auftreten. Sie werden voraussichtlich für immer eine höchst unbequeme Angelegenheit für den systematischen Lichenologen bleiben. Man denke an die Massen der auf Blättern lebenden tropischen Flechten, bei denen sich nicht im geringsten von einem normalen Habitus oder etwas Ähnlichem sprechen läßt. Man muß aber hiermit auch in Zusammenhang bringen die Erscheinungen der Cephalodien und der sogenannten Flechtenparasiten — Gegenstände, auf die ich in ähnlicher Weise schon wiederholt hingedeutet habe.

Bei meinen seit Jahren angestellten und unter verschiedensten Bedingungen fortgeführten Beobachtungen über die *vegetative Vermehrung* bei Flechten aus der Gattung *Cladonia* (*Tobler*, 1932, und *Tobler-Mattick*, 1938), habe ich mehr und mehr auch schon die Fragen nach den besonderen Bedingungen für die oder jene Entwicklungsrichtung beider oder der einen oder anderen Komponente beantworten können. Die Entwicklungsbedingungen liegen zunächst stets im Rahmen der *Faktoren Feuchtigkeit* und *Belichtung* und sind somit weitgehend

von der *Jahreszeit* abhängig. Außerdem aber sind auch die Formen gruppenweise im Besitz einer um so stärkeren Vermehrung durch Bruchstücke, als sie gleichzeitig hinsichtlich der Pilzfruchtbildung steril zu werden beginnen oder schon geworden sind (*Rämsch*, 1939). Hierzu sei gleich die Bemerkung angefügt, daß mit der Zunahme der Sterilität wiederum die systematischen Schwierigkeiten beginnen und daß auch eine vegetative Gemeinschaftsbildung nicht gleichartiger Bruchstücke unter Umständen der Systematik unüberwindliche Schwierigkeiten bereiten dürfte. Dies ist der Stand unserer gegen-



Abb. 1. Mauer mit Anflügen von Pilzen, Algen, Flechten, Moosen, Richtung gegen Westen (Schillerstraße in Dresden-Loschwitz).

wärtigen Erfahrungen auf diesem Gebiete. Sie sind von Bedeutung für die Kenntnis und allgemeine Entwicklung des Zusammenlebens von Pilz und Alge und bringen in gewisser Weise, aber auf ganz anderem Wege, auch eine phylogenetische Vorstellung zum Bewußtsein, wie sie etwa *Reinke* in ganz anderer Art längst gegeben hatte. Auf die Unterschiedlichkeit der beiden Betrachtungen braucht hier nicht hingewiesen zu werden.

Setzen wir aber nun die Erforschung der heutigen Entstehung der Flechtenindividuen in der Natur weiter fort, so ist die Grundlage dafür natürlich in den drei von mir wiederholt betonten Punkten zu sehen: Die Symbiose, sofern sie zustande kommt, wirkt auf die *Gestalt*, auf den *Stoffwechsel* und auf die *Fortpflanzung* (*Tobler*, 1932 u. 1934).

Ich habe nun in jüngster Zeit mich ausführlich um bestimmte Vorkommnisse solcher Gemeinschaften, fertiger oder unfertiger oder halbfertiger in der Natur bemüht, wie ich sie früher schon als *Flechtenanflüge* bezeichnete und wie sie am besten zu verstehen, vielleicht auch

zurückzuführen sind im Anschluß an die von *Herrmann* (1935) studierte Entwicklung von *Cladonia*-Soredien. Ich ging dabei in den letzten Jahren von einem ganz bestimmten Standort aus, nämlich meist aus Sandstein bestehenden, schwach rückwärts geneigten Mauern, die an der Schillerstraße in Loschwitz bergauf die eine Straßenseite begrenzen (Abb. 1). In Nachahmung dieser Standorte habe ich späterhin auch eine eigene derartige Mauer im Botanischen Garten Dresden aufgebaut. Man findet an solchen Stellen zunächst in den Fugen zwischen den Sandsteinen, dann aber auch über die Sandsteinflächen, sich *oft in tränenartigen Streifen herunterziehend, feine graukörnige bis grünliche Anflüge. Bei näherer Untersuchung stellte sich hier mit immer wiederkehrender Deutlichkeit ein jahreszeitlicher Unterschied in der feineren Morphologie dieser Gebilde heraus.*

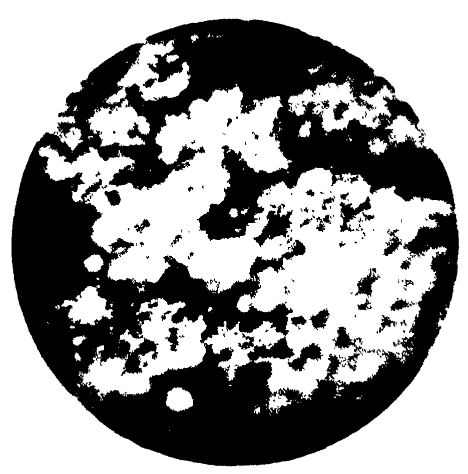


Abb. 2. Reine Pilzentwicklung, „Rosenkohlstadium" im Frühjahr. Vergr. 6 ×.

Zunächst findet man nicht selten, meist in trockenerer Zeit und am Beginn feuchterer Perioden, helle, etwa an Rosenkohl erinnernde Köpfchen kleinsten Umfangs von rosa bis weißer Farbe. Sie stellen *reine Pilzvegetation*, ohne jedes Vorhandensein von Algen,

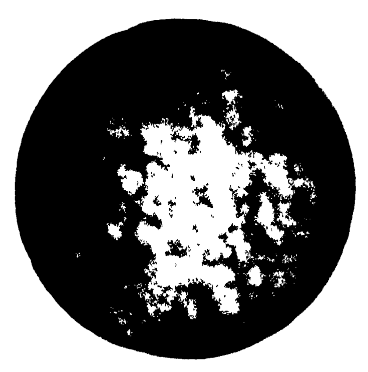


Abb. 3.

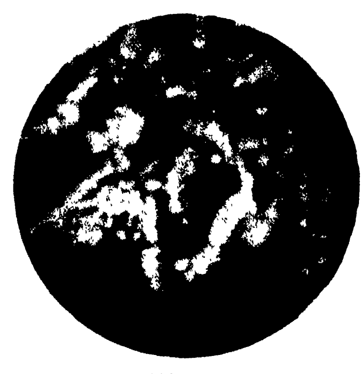


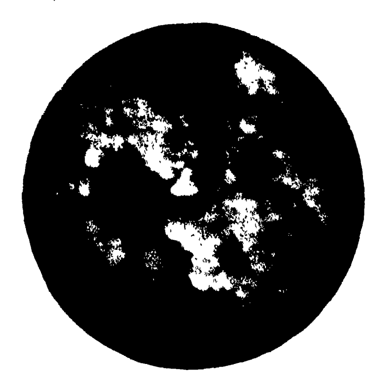
Abb. 4.

Abb. 3. Auf und in den Pilzklümpchen treten — auf der Photographie nur schwach sichtbare — Algenpunkte auf, die Klümpchen werden etwas fester. Vergr. 6 ×.

Abb. 4. Entstehung von Flechten: Läppchenbildung (Thallusschuppen von Cladonia?), feste Abgrenzung der Blättchen deutlich. Vergr. 6 ×.

dar, sind unregelmäßig in ihrer Oberfläche, aber wachsen ungefähr zentrifugal nach allen Seiten und verdichten sich damit zu rasenartigen Gebilden (Abb. 2). Es folgen dann mit zunehmender Feuchtigkeit gelegentlich ähnliche köpfchenartige Massen mit ganz feinen grünen Pünktchen, die teils oberflächlich, teils etwas eingesenkt erscheinen und bei stärkerer Vergrößerung im Auflicht (Zeißsches Auflichtgerät!) in größter Deutlichkeit *Einsprengungen von grünen Algenklümpchen in den Pilzmassen* erkennen lassen (die allerdings die einfarbige Abb. 3 wenig erkennen läßt). Hieraus entwickeln sich noch später *kleine lappenartige Gebilde*, die bei etwas gekräuseltem Rand schon fast den Bau eines Flechtenläppchens besitzen können (Abb. 4). Ich kann nicht umhin, diese





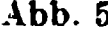


Abb. 5. Abb. 6.

Abb. 5. Die Läppchen oder blattartigen Thalli von Abb. 4 beginnen wieder am Rande auszusprossen zu isidiösen (kohlkopfartigen) Bildungen: Zustand (im Herbst und) im Winter. Es erfolgt auch Einreißen der Lappenränder. Vergr. 6 ×.

Abb. 6. Stärkeres Aussprossen, Entstehung von wiederum rein pilzlichen, klümpchenartigen Massen, Zustand gegen das Frühjahr hin. Vergr. 6 ×.

bereits als „Flechtenthalli“ zu bezeichnen. Es bleibt dahingestellt, welcher Gattung oder Art solche Gebilde angehören. Manches, vor allem *gelegentliche* weitere Entwicklung, spricht für eine Zugehörigkeit zur Gattung *Cladonia*. Dieser Zustand herrscht bei Beginn des Winters vor und er verändert sich in der Richtung, daß der Rand dieser Lappen durch kräftiges und unregelmäßiges Wachstum *immer stärker gekräuselt* und zugleich mehr grau wird, wonach auch *Einrisse* entstehen (Abb. 5 und 6), aus denen wiederum Wucherungen und gelegentlich auch — eben als Hinweis auf die genannte Gattung — Podetien hervorgehen können. Das kommende Frühjahr aber verändert die Erscheinung aufs neue: Die Ränder der Lappen beginnen reichlich und *erneut mit reinem Pilzwachstum* auszusprossen und aus den immer wieder bröckliger werdenden und sich voneinander trennenden Klümpchen entsteht wiederum das eingangs genannte Stadium, das ich mit Rosenkohl

verglich. Die lappige oder blattähnliche Form des Ausgangs geht wieder verloren und wir dürften es hier nach der sonst üblichen Morphologie mit Isidien zu tun haben. *Diesen Entwicklungsgang habe ich zu mehreren Malen nun an den gleichen Stellen hintereinander verfolgen können*, und man erkennt daraus wohl mit hinreichender Deutlichkeit, wie ein *Wechsel des Übergewichts der einzelnen Teile und damit also ein Auf und Ab in dem Charakter eines flechtenartigen Organismus* angenommen werden muß. *Ursache* hierfür ist in diesem Falle nicht verschiedenartiger Standort, sondern lediglich *der jahreszeitliche Wechsel* in Feuchtigkeit (und vielleicht auch Lichtgenuß). Sehr selten gelangt eine Vegetation solcher Anflüge an den zur Beobachtung gewählten

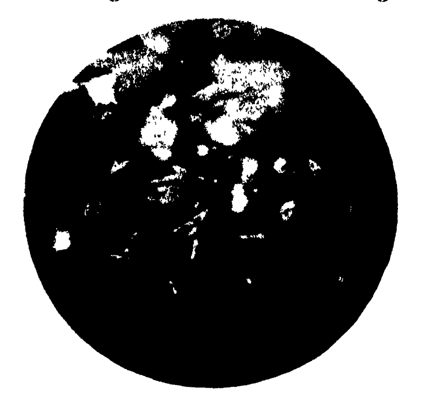


Abb. 7.



Abb. 8.

Abb. 7. Der Pilz als Epiphyt von Moosen in Form solcher Klümpchen, wie sie von den Rändern der Lappen sich ablösen. Vergr. 2,5 ×.

Abb. 8 wie Abb. 7, einzelne Pilzindividuen noch deutlicher. Vergr. 2,5 ×.

Stellen zu einer vollen und systematische Erfassung der Art gestattenden Entwicklung. Hier ist es also leicht, den reinen Flechtenpilz zu bestimmter Zeit vorzufinden und hier muß die Frage nach dem gelegentlichen Zustandekommen neuer Flechtenindividuen durch heute erfolgendes Hinzutreten von Algen durchaus mit ja beantwortet werden. Freilich ist die *Flechtensymbiose nicht von Dauer* und kommt oft nicht zur bleibenden Ausgestaltung.

Wie sehr der Flechtenpilz an solchen Stellen auch selbständig noch seinen Weg zu gehen vermag, beweist das gar nicht seltene Auftreten der *Pilzklümpchen als Ansiedler auf jungen Moospflänzchen*, wie sie innerhalb der Anflüge uns gelegentlich begegnen (*Tobler*, 1936). Hier sitzen die erwähnten rein pilzlichen, weißen Hyphenklümpchen unmittelbar den Moosblättchen oder -stämmchen auf (Abb. 7 und 8). Sie überziehen sie bisweilen so stark, daß das Moos darunter zu leiden

beginnt, ja, zugrunde geht, worauf der Flechtenpilz auf der verrottenden Unterlage offenbar um so besser weiterwächst. Doch möchte ich keineswegs einen Parasitismus des Flechtenpilzes auf den Moosen annehmen. Die Ablösungsmöglichkeit der Klümpchen von den Blättern ist stets sehr groß und ein Eindringen habe ich nicht beobachten können.

Hierneben dürfte die Frage gestellt werden, ob denn angesichts der Zufälligkeit des Zusammentreffens solcher freien Pilze mit aus der nächsten Nachbarschaft herangebrachten oder vom Pilz erreichten Algen nicht auch Anlaß zu neuen Kombinationen geben könnte. Denkbar

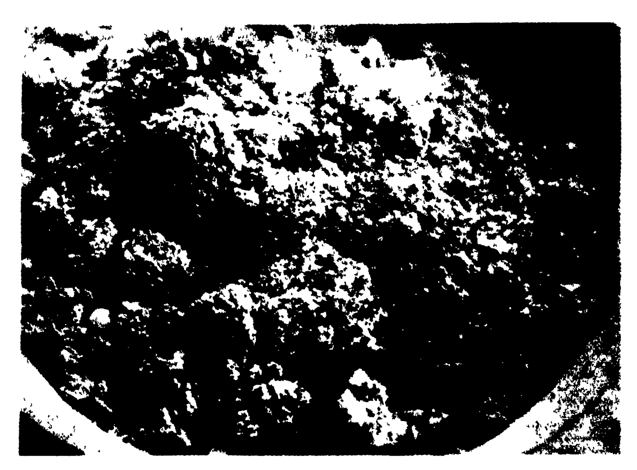


Abb. 9. Aus von der Mauer entnommenen Pilzanflügen hervorgegangene Entwicklung von Flechtenthalli in einer Kultur auf Erde. $^1/_2$ natürl. Gr.

ist das wohl, aber die Auswahl von Pilz- wie Algenformen scheint gering, und im allgemeinen dürften an diesen Standorten auch beide gleichen Ursprung, nämlich aus auf die Mauer gelangten Flechtenbruchstücken haben und aus diesem Grunde innerhalb eines engen Bezirks wohl als Abkömmlinge der gleichen Flechte immer wieder gleiche Kombination ergeben müssen. Daß Abweichungen gegenüber der erwähnten Gestaltenfolge zu verschiedener Jahreszeit auch nach Ort, Himmelsrichtung und Witterung vorkommen, halte ich aber für sicher. Und aus diesem Grunde habe ich mich eben zunächst streng an einen Standort im Verlauf von 3 Jahren gehalten.

Natürlich darf ich die Frage nach der *systematischen Zugehörigkeit* meiner Funde nicht ganz umgehen, wenn sie mir auch weniger wichtig erscheint als die Betrachtung der Entwicklung des Zusammenlebens. Der Flechtensystematiker gibt derartige Anflüge bisweilen mit bestimmten Gattungs- und Artnamen aus. Das bekannte Exsikkatenwerk von *Schade-Stolle-Riehmer*, „Lichenes Saxonici Exsiccati“, bringt unter Nr. 411 ein ganz meinen Funden gleichendes Objekt als „*Psoroma*

lanuginosum Ach.". Diese Bezeichnung hat nach meinem Ermessen keine Berechtigung, da Früchte davon niemals bekannt geworden sind. Ich habe ganz ähnliches Material auch *auf Erde in Schalen* weiter kultiviert, also unter Bedingungen, die nicht mehr die der Stellen sogenannter Anflüge sind, und habe nach mehreren Jahren, meist bleibend, offenbar zu *Cladonia* gehörende Thalli erzielen können (Abb. 9). Ich neige also durchaus dazu, auch die sogenannte *Psoroma* etwa als hierin gehörig aufzufassen. Jedenfalls dürfte den Gegenbeweis zu erbringen unmöglich sein. Andere gestaltlich ziemlich ähnliche Objekte mit mehr gelblicher Färbung mögen in andere Formenkreise verwiesen werden. Sie haben mir bei der Untersuchung vorläufig noch nicht gedient. Daß auch innerhalb anderer Gruppen Dauervorkommnisse nur vegetativ sich entwickelnder Formen mit einer durch ihre Klumpenbildung an meine Beobachtungen erinnernden, hinsichtlich des Vorkommens bestimmter Farbstoffe aber wesentlich anderen Bildung in andere Richtung zu verweisen wären, bezeugen die Schwefelflechten der Sächsischen Schweiz, die ja erst dann zu einer systematischen Klarheit gelangen, wenn sie Pilzfruchtformen erzeugen, was bekanntlich an manchen Standorten außerordentlich selten ist (*Schade*, 1917).

Die letzte Frage wäre wohl noch die, *warum denn an gewissen Standorten die Flechtenentwicklung soviel weniger vollkommen wird* als an anderen? Die Entwicklung des Zusammenlebens von Pilz und Alge ist, physiologisch betrachtet, unendlich verwickelt schon deshalb, weil bekanntlich ja die Wachstumsbedingungen zweier so gänzlich verschiedener Organismen aufeinander abgestimmt oder zueinander in ein bestimmtes Gleichgewicht gebracht werden müssen, was begreiflicherweise selten genug der Fall ist. Ich stehe aber auch nicht an, für das stärkere oder geringere Entwicklungsvermögen der Teile und besonders des Pilzes auch noch andere Organismen, die vielleicht niemals in der noch lockeren Gruppierung fehlen, in Anspruch zu nehmen. Eine zufällige Beobachtung in meinen Laborkulturen auf künstlichen Nährböden, bei denen ich ebenfalls die Anflüge von *Cladonia*-artiger Natur zum Ausgang nahm, brachten mir das Ergebnis, daß bei Anwesenheit einer roten Lufthefe (*Rhodotorula glutinis*) das Pilzwachstum wesentlich besser verlief als ohne diesen Teilhaber. Versuche über Zusatz dieses rein gezüchteten Organismus zu sich entwickelnden halbfertigen Flechten bewies mir das mehrfach[1]. Ich lege auf diese Laborbeobachtungen, deren Anlage natürlich durchaus nicht den natürlichen Verhältnissen entspricht, an sich keinen bedeutenden Wert. Ich glaube mich aber

[1] Den naheliegenden Versuch, den Einfluß eines Wuchsstoffzusatzes zu beobachten, habe ich schon mit Erfolg vorgenommen, berichte darüber aber erst später in einer die Symbiose als Wuchsstoffproblem behandelnden Arbeit.

immerhin dazu berechtigt, anzunehmen, daß außer den Faktoren Feuchtigkeit und Belichtung auch solche Momente, die selbstverständlich in der Natur dauernd wirksam sein können, ausschlaggebend für den Verlauf des Zusammenlebens von Pilz und Alge sein müssen.

Ich schließe mit dem Hinweis darauf, daß gerade durch diese neuen Beobachtungen die Labilität des Gleichgewichts der Symbiose heute entstehender und lebender Flechten erneut nachgewiesen wurde und daß wir uns daran gewöhnen sollten, die Gruppe der *Flechten auch*



Abb. 10. Ein *Polyporus* (*betulinus*), rechts von der Mitte nach hinten ein Auswuchs, der Algen in Pilzmasse verstrickt enthält, dort findet ein lebhaftes und aus der Form des Pilzfruchtkörpers herausfallendes Wachstum statt. $^1/_2$ nat. Gr.

heute noch als zu neuem Ursprung von neuen Gemeinschaften befähigt anzusehen. Bedürfte es eines Hinweises auf etwas ferner liegende Erscheinungen, so wäre es der Befund, wie man ihn an Fruchtkörpern von *Polyporus* bisweilen machen kann: aus verletzten Stellen wuchert Pilzmycel und nimmt aus der Luft oder dem Niederschlag der Umgebung Algen in einer gewissen Weise sichtbar in sich auf (Abb. 10). Die Gestalt des Zusammenlebens erinnert an Umspinnung, und wir hätten hier gleichsam den *Anfang einer neuen Basidiomycetflechte* vor uns, was um so interessanter ist, als die Zahl derartiger Gemeinschaften ja noch gering ist und ihre Form nicht allzu feste Bahnen eingeschlagen hat.

Literatur.

Herrmann, Beih. Bot. Centralbl. **58A**, 651ff., 1935. — *Rämsch*, diese Zeitschr. **10**, 279ff., 1939. — *Schade*, Abhandl. d. Isis-Dresden **1916/17**, S. 21ff. — *Strato*, Hedwigia **68**, 11ff., 1921. — *Tobler*, Ber. d. Deutsch. Bot. Ges. **38**, 11ff., 1921; Beih. Bot. Centralbl. **49** (Erg.-Bd., Drude-Festschr.), 482ff., 1932; Die Flechten. Jena, G. Fischer, 1934; Ber. d. Deutsch. Bot. Ges. **54**, 401ff., 1936. — *Tobler* u. *Mattick*, Bibliotheca Bot., Heft 117, 1938.

(Aus dem Institut für Mikrobiologie der königlichen Universität Neapel.)

Der Abbau der Acetessigsäure durch Bacterium coli.

Von

L. Califano.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 18. August 1942.)

Wenn man eine Aufschwemmung von *Bacterium coli* bei 37° in Gegenwart einer gesättigten monocarboxylischen Fettsäure schüttelt, so erhöht sich der Sauerstoffverbrauch, weil die Säure durch die Bakterienzellen dehydriert wird. Die Zunahme ist gering für die ersten Glieder der Reihe (mit Ausnahme der Ameisensäure und der Essigsäure) und wächst mit der Länge der Kohlenkette, so daß bei der Önanthsäure gegenüber den Proben ohne Substrat die verbrauchte Sauerstoffmenge mehr als doppelt so groß ist, mehr als dreifach bei der Pelargonsäure und mehr als fünffach bei der Myristinsäure. Die entsprechenden Ergebnisse sind in Tabelle I angeführt.

Tabelle I.

	O_2-Verbrauch ccm		O_2-Verbrauch ccm		O_2-Verbrauch ccm
Kontrolle	100	Önanthsäure .	205	Myristinsäure.	576
Ameisensäure .	215	Caprylsäure ..	287	Palmitinsäure	484
Essigsäure ...	309	Pelargonsäure	469	Margarinsäure	455
Propionsäure ..	128	Caprinsäure ..	350	Stearinsäure .	629
Buttersäure ...	108	Undecylsäure.	364	Arachinsäure .	256
Valeriansäure .	112	Laurinsäure ..	400		
Capronsäure ..	110	Tridecylsäure.	278		

Die Oxydation der monocarboxylischen Fettsäuren wurde durch *Quastel* nach der *Thunberg*schen Methode untersucht, jedoch mit negativem Erfolg; *Mazza* und *Cimmino* zeigten dagegen die große Fähigkeit des *Bacterium coli* Palmitinsäure und Stearinsäure zu dehydrieren, und *Franke* und *Peris* bestätigten diese Tatsache und stellten außerdem die Oxydationsfähigkeit anderer Säuren dieser Reihe fest, besonders durch *Pseudomonas* sowie durch *Sarcina lutea*. Im allgemeinen sind die höheren Glieder der gesättigten Fettsäurenreihe leichter oxydierbar als die mittleren und die unteren, mit Ausnahme der Ameisensäure und der Essigsäure.

Neue durch *Cutinelli* ausgeführte Versuche zeigen, daß der *Tuberkelbazillus* die Fettsäuren oxydiert, während der *Gonococcus* dazu nicht fähig ist. Eine hervorragende Fähigkeit zur Dehydrierung der Fettsäuren besitzt die Gattung *Brucella* (*Attimonelli*).

Der Vorgang des oxydativen Abbaues der Fettsäuren durch die Bakterien ist bis jetzt noch unbekannt. Da nun die durch *Bacterium coli* hervorgerufene Oxydation beachtenswert schnell erfolgt, lag es nahe zu untersuchen, ob der Fettsäurenabbau durch eine β-Oxydation zu Ketonkörperbildung führt. Prüft man jedoch die Flüssigkeit, in der die Oxydation stattgefunden hat, auf das Vorhandensein von Acetessigsäure und β-Oxybuttersäure, so bekommt man ein negatives Ergebnis, auch wenn man große Bakterienmassen zusammen mit großen Säuremengen verwendet und die Prüfung nach einer genügenden Zeitspanne ausführt, um die fast vollständige Oxydation der vorhandenen Säuren zu erzielen. Dieses Ergebnis läßt an zwei Möglichkeiten denken:

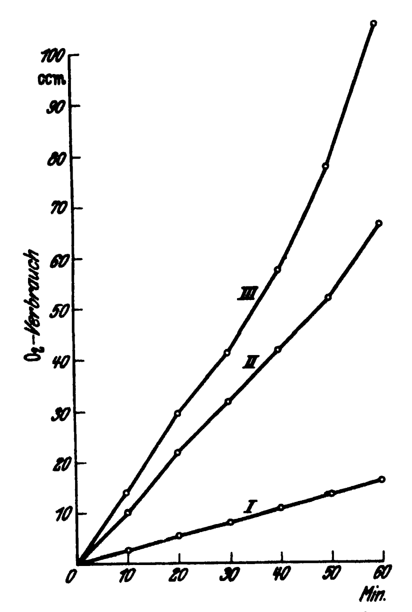


Abb. 1. Kurve I: gewaschene Bakterien (Leerversuche); Kurve II: dieselben mit Acetessigsäure-Natrium; Kurve III: dieselben mit Acetessigsäure-Natrium + Phosphat.

1. Daß der Fettsäurenabbau auf anderem Wege als dem der β-Oxydation erfolgt.

2. Daß die gebildeten Ketonsäuren schnell verbrannt werden und zwar sowie sie gebildet sind, derart, daß sie sich niemals in bestimmbaren Mengen anhäufen.

Es wurde ferner die Oxydationsfähigkeit der β- (Hydro-) Oxybuttersäure und der Acetessigsäure untersucht. Diese beiden Säuren werden weitgehend durch *Bacterium coli* oxydiert, so daß, falls sie sich während des Abbaues der gesättigten Fettsäuren bilden, keine Möglichkeit besteht, sie nachzuweisen wegen der eintretenden schnellen Oxydation, welche aerobisch stattfindet.

Besonderes Interesse erweckt aus verschiedenen Gründen der Oxydationsverlauf der Acetessigsäure. Diese Oxydation verläuft sehr schnell und die Geschwindigkeit nimmt mit der Zeit zu, was wahrscheinlich andeutet, daß beim Abbau der Ketonsäure sich Körper bilden, die leichter als die Säure selbst verbrennen. Die Oxydationsgeschwindigkeit wird erheblich durch Phosphatanwesenheit vermehrt, wie ersichtlich in Abb. 1. Es ist sehr wahrscheinlich, daß die Phosphate an der Reaktion teilnehmen, und daß die Steigerung der Oxydationsgeschwindigkeit nicht bloß eine Pufferfunktion ist, und zwar, sei es, weil die Aktivierung durch sehr kleine praktisch keine Pufferwirkung besitzende Phosphat-

mengen stattfindet, sei es, weil sie auch erfolgt, wenn auch in verschieden hohem Maße, mit Phosphatgemischen von recht verschiedenem p_H[1].

Die Annahme einer Phosphorylierung der Acetessigsäure oder ihrer Spaltprodukte wird durch die Tatsache unterstützt, daß die Aktivierung durch Monojodessigsäure und Monobromessigsäure stark gehemmt wird. Die Fluoride dagegen üben eine geringe hemmende Wirkung aus, die vielleicht auch zu vernachlässigen ist.

Es ist wahrscheinlich, daß auch, wenn man der Untersuchungsflüssigkeit keine Phosphate hinzufügt, bei der Oxydation des Natrium-Acetacetats Phosphationen beteiligt sind, die als Verunreinigungen oder als Spaltprodukte der Autolyse der bakteriellen Zellen vorhanden sind. Monojodessigsäure und Monobromessigsäure hemmen in der Tat die Oxydation der Acetessigsäure auch in den Versuchen, bei denen Phosphate nicht hinzugefügt sind.

Ähnliche beschleunigende Wirkung der Phosphate wurde auch bei Glucose und bei Bernsteinsäure festgestellt, was den vorhergegangenen Untersuchungen von *Yudkin* entspricht. Bei den monocarboxylischen Fettsäuren ist die Wirkung der Phosphationen unsicher und jedenfalls nicht zu vergleichen mit der, die sie auf den Abbau der Acetessigsäure und der Bernsteinsäure ausüben.

R. Deotto hat, auf meine Anregung hin, schon seit längerer Zeit die Versuche über die Oxydation der Acetessigsäure vertieft, und er ist auf verschiedene interessante Schlußfolgerungen gekommen, unter anderem. daß die Acetessigsäure eine aktivierende Wirkung auf die Atmung der Bakterien selbst ausübt, ferner, daß nur die Keime in der *S*-Phase die Fähigkeit haben, die Ketonsäure zu oxydieren, während die in der *R*-Phase ganz inaktiv sind. Nach *Deotto* geschieht der Abbau der Acetessigsäure nicht auf dem Weg über β-Oxybuttersäurebildung. Unter den Spaltprodukten kann man weder die Gegenwart der Brenztraubensäure noch die der Bernsteinsäure nachweisen; es erscheinen jedoch Körper, welche Verbindungen mit Bisulfit geben und Körper mit doppelter Bindung. Unsicher ist die Methylglyoxalbildung und auszuschließen ist die von Acetylaldehyd und von Milchsäure.

Experimenteller Teil.

Es kamen zur Verwendung 16- bis 20stündige Kulturen von *Bacterium coli* auf Agar. Die Bakterienmasse wurde abgehoben und in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt, im Verhältnis von 5 ccm für jede Agar Röhre. Die Aufschwemmung wurde durch Papier filtriert, um die Bakterienklümpchen und die Agarteilchen zu entfernen,

[1] Siehe *Cutinelli*, welcher diese Erscheinung als Funktion des p_H-Wertes untersucht hat.

Protokoll 1.

Leerversuche	Acetessigsäure-Na m/40	β-Hydroxybuttersäure-Na m/40
$X_{O_2} = -30{,}59$	$X_{O_2} = -118{,}44$	$X_{O_2} = -74{,}93$

Protokoll 2. Phosphatpuffer m/45, $p_H = 7{,}4$, acetessigsaures Natrium m/10, Jodacetatlösung m/100, Bromacetatlösung m/100, Einsatz 0,2 ccm KOH, 5% Gasraum Luft.

	1	2	3	4	5	6	7	8
Hauptraum	1 ccm Bakterienaufschwemmung							
	0,5 ccm Ringer 0,5 „ Phosphat	0,4 ccm Ringer 0,1 „ Jodacetat 0,5 „ Phosphat	0,4 ccm Ringer 0,1 „ Bromacetat 0,5 „ Phosphat	1 ccm Ringer	0,5 ccm Ringer 0,5 „ Phosphat	0,9 ccm Ringer 0,1 „ Jodacetat	0,4 ccm Ringer 0,1 „ Jodacetat 0,5 „ Phosphat	0,4 ccm Ringer 0,1 „ Bromacetat 0,5 „ Phosphat
Anhang	0,5 ccm Ringer	0,5 ccm Ringer	0,5 ccm Ringer	0,5 ccm Acetessigsäure	0,5 ccm Acetessigsäure	0,5 ccm Acetessigsäure	0,5 ccm Acetessigsäure	0,5 ccm Acetessigsäure
60 Min. nach Einkippen O_2-Verbrauch	− 22,08	− 19,52	− 17,33	− 84,87	− 105,76	− 39,68	− 52,47	− 43,40

Protokoll 3.

Leerversuche	Acetessigsäure-Na m/40	Acetessigsäure-Na m/40 + Pufferphosphat m/180 p_H 7,34	Acetessigsäure-Na m/40 + Natriumfluorid m/200	Acetessigsäure-Na m/40 + Pufferphosphat m/180 p_H 7,3 + Natriumfluorid m/200
$X_{O_2} = -11{,}97$	$X_{O_2} = -83{,}08$	$X_{O_2} = -104{,}60$	$X_{O_2} = -79{,}20$	$X_{O_2} = -100{,}50$

Protokoll 4.

Leerversuch	Bernsteinsäure-Na m/100	Bernsteinsäure-Na m/100 + Pufferphosphat m/180 p_H 7,34
$X_{O_2} = -18{,}62$	$X_{O_2} = -67{,}65$	$X_{O_2} = -211{,}50$

daraufhin zentrifugiert und die mit einer großen Menge physiologischer Kochsalzlösung zur Auswaschung zweimal von neuem zentrifugierten Keime schließlich in physiologischer oder in Ringerlösung suspendiert, so daß jeder ccm von Emulsion einer Kulturröhre entsprach. Auf diese Art erhält man Bakterien, welche eine sehr geringe Atmungsgröße zeigen, weil sie größtenteils ihre eigenen Donatoren verloren haben und welche deshalb in Gegenwart eines durch sie leicht verbrennbaren Substrats sofort eine Zunahme an Sauerstoffverbrauch zeigen. Keime unter solchen Bedingungen entsprechen den ruhenden Bakterien von *Quastel*.

Der Sauerstoffverbrauch wurde manometrisch nach *Warburg* gemessen. Die birnenförmigen Gefäße enthielten im zentralen Behälter Kalilauge, um die Kohlensäure zu binden. Nach dem Erreichen des Temperatur- und Druckausgleichs wurde das Substrat durch den Seitenansatz eingegossen, um so von Anfang an die Zunahme des Sauerstoffverbrauchs zu messen. Es gelangten Fettsäuren (pro analysi) von *Schering-Kahlbaum*, *British Drug House* und *Fraenkel & Landau* zur Verwendung. Die Fettsäuren wurden als Na-Salze nach Zusatz einer berechneten Natronlaugemenge gebraucht. Das p_H der Lösung wurde elektrometrisch bestimmt und wenn nötig auf 7,2 eingestellt. Meist wurde mit physiologischer Kochsalzlösung gearbeitet, welcher Bicarbonat hinzugefügt war, manchmal auch mit Ringerlösung. Die Acetessigsäure wurde aus Äthylacetacetat nach *Ljunggren* dargestellt; der Titel der im Eisschrank gehaltenen Lösung wurde jedesmal geprüft und es wurde festgestellt, daß er nur langsam abnimmt. Die Bestimmung der Acetessigsäure wurde nach der Verbesserung der manometrischen Methode von *Quastel* und *Wheatley* nach *Edson* erzielt, d. h. durch Decarboxylation der Säure mit Anilinhydrochlorat. Die Flüssigkeit wurde durch Citronensäure angesäuert, das Anilinhydrochlorat nach Erreichen des Temperatur- und Druckausgleichs aus dem Seitenansatz in den Hauptraum eingekippt und der durch Kohlensäureentwicklung verursachte positive Druck manometrisch gemessen.

Die β-Oxybuttersäure wurde nach *Edson* bestimmt. Monobromessigsäure und Monojodessigsäure (British Drug House) wurden als Na-Salze hergestellt.

Literatur.

Attimonelli, R., Boll. Ist. Sier. Mil. **21**, 238, 1942. — *Cutinelli, C.*, ebenda **19**, 88, 141, 1940. — *Derselbe*, ebenda **20**, 391, 1941; **21**, 137, 1942. — *Yudkin, J.*, Biochem. J. **27**, 1849, 1933. — *Franke, W.*, u. *W. Peris*, Biochem. Zeitschr. **295**, 61, 1938. — *Mazza, F. P.*, u. *A. Cimmino*, Rend. Acc. Lincei **20**, 113, 1934. — *Deotto, R.*, Enzymologia **8**, 289, 1940. — *Edson, N. L.*, Biochem. J. **29**, 2082, 1935. — *Ljunggren, G.*, Biochem. Zeitschr. **145**, 422, 1924. — *Quastel, J. H.*, u. *A. H. M. Wheatley*, Biochem. J. **27**, 1753, 1933; **29**, 2773, 1935.

(Aus dem Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen.)

Zur Frage der Rhizosphäre und Bodenimpfung mit Azotobacter.

Von

Artur Starc.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 24. September 1942.)

I.

Unter dem Einfluß der schon von *L. Hiltner* (5) aufgestellten Hypothese, daß die Pflanzen in ihrer Rhizosphäre die Entwicklung einer spezifischen und für die Pflanzenernährung nützlichen Mikroflora fördern, wurde für manche Kulturpflanzen behauptet, daß sie in ihrem Wurzelbereich günstige Bedingungen für Entwicklung von *Azotobacter* darbieten sollen, der seinerseits ihnen den aus der Luft gebundenen Stickstoff liefere.

So sollen sich infolge dieser Verhältnisse gewisse Kruciferen (*Senf, Raps* usw.) in stickstoffarmen Böden gut entwickeln [*L. Hiltner* (6); *A. Cauda* (2); *H. Poschenrieder* (18)]. Für Tabak haben *S. Kostičev, A. Šeloumova* und *O. Šuljgina* (9) gefunden, daß seine hohen Erträge in Böden der Krim auf die Tätigkeit von *Azotobacter* zurückzuführen seien. Auch in der Rhizosphäre der *Leguminosen* wurde diesem Stickstoffbinder eine gewisse Bedeutung beigemessen; *F. Löhnis* (13) z. B. nimmt an, daß der erhöhte N-Gehalt in von *Leguminosen* bewachsenen Böden weniger den *Knöllchenbakterien* zuzuschreiben ist, als der Tätigkeit der nichtsymbiontischen Luftstickstoffbinder. Dieses Problem wurde besonders aktuell, seitdem *G. Truffaut* und *N. Bezssonoff* (30) behaupteten, daß es ihnen gelungen sei, in stickstoff- und kohlenstofffreien, aber mit Stickstoffbindern geimpften Substraten den *Mais* bis zur Reife zu kultivieren. Im Anschluß an diese Untersuchungen, nach denen die Energiequelle für *Azotobacter* in den Ausscheidungen der Wurzel liegen mußte, lebten die schon vorher gemachten feldmäßigen Bodenimpfungen mit *Azotobacter*-Präparaten wieder auf — ungeachtet von den vielen in diesem Zusammenhang noch zu lösenden Fragen.

G. Naundorf (16) und *H. Amlong* (1) führten mit der neuen AZ.-Kultur (*Azotobacter*-Präparat) vom Radicin-Institut Feldversuche durch und fanden eine gute Wirkung bei *Hafer, Mais* und *Kartoffeln*, besonders unter Zugabe von „Ravit“, das Bakterienwirkstoffe enthalten sollte (Vitamine, Säuren, Spurenelemente). *G. Naundorf* stellte beim *Mais* eine Ertragssteigerung von 30,3% mit AZ. und 39,7% mit AZ. + Ravit fest, d. h. mehr als mit der normalen N-Düngung (18,3%). Hier ist der Kontrollversuch mit „Ravit“ ausgeblieben, ebenso in den genauer angeführten Versuchen von *H. Amlong*, der übrigens bei *Kartoffeln* nicht so große Unterschiede finden konnte (+ 4% mit AZ. und 16% mit AZ. + Ravit). Eine eindeutige Vergleichs-

basis ist aber schon deshalb nicht vorhanden, weil die Naßbeize bei den Kartoffeln bzw. Getreidesamen in den Kontrollen nicht ausgeführt wurde.

In Rußland hat in den letzten Jahren das *Azotobacter*-Präparat „Azotogen" (von *Šeloumova*) und neuerlich „Azotobakterin" (von *Savostin*) große Verwendung gefunden. Als durchschnittliche Ertragserhöhungen der Kulturpflanzen auf Grund von dreijähriger Anwendung dieses Präparates in verschiedenen Gebieten führt *G. Petrenko* (17) an: bei *Weizen* 1 bis 3 dz/ha (10 bis 20%), bei *Hafer* 1,5 bis 2,5 dz/ha (10 bis 15%), bei *Kartoffeln* 15 bis 50 dz/ha (12 bis 15%) und auch bei anderen Kulturpflanzen, wie *Zuckerrüben*, *Lein*, *Hanf* und *Obst* eine durchschnittliche Ertragssteigerung von 10 bis 30% gegenüber der Kontrolle. Jedoch muß bemerkt werden, daß oft auch negative Ergebnisse gefunden wurden, und daß noch immer Kontroversen über die technische Herstellung wie auch über das aktive Prinzip der Präparate bestehen.

Die Feldversuche sind in ihren Ergebnissen oft sehr variabel und schwer zu vergleichen, besonders wenn die Bodenverhältnisse und die Zusammensetzung der Mikroorganismenflora, insbesondere das *Azotobacter*-Vorkommen nicht genauer bekannt sind. Die vielen Widersprüche zeigen, daß man zunächst durch exakte Laboratoriums- und Gefäßversuche das Verhältnis von *Azotobacter* zu den höheren Pflanzen in bezug auf das Rhizosphärenproblem klären muß, wobei man einerseits die Bodenfaktoren und Pflanzenarten, andererseits die *Azotobacter*-Rassen und die Konkurrenz der anderen Bodenmikroorganismen der Rhizosphäre berücksichtigen muß. Auf diese Fragen werden wir später zurückkommen.

II.

Um den Einfluß der *Azotobacter*-Impfung auf den Pflanzenertrag, wie im allgemeinen das Vorkommen von *Azotobacter* in der Rhizosphäre festzustellen, wurde ein Gefäßversuch mit *Mais* im reinen Quarzsand durchgeführt; Stickstoff wurde nur in minimaler Gabe zugefügt, um das Anwachsen der Pflanzen zu ermöglichen, während die Zugabe der C-Quelle für *Azotobacter* ganz ausblieb, um so den Einfluß der Wurzelausscheidungen auf die Luftstickstoffbindung und also auf die Maisernte festzustellen.

Mitscherlichgefäße wurden mit 7 kg Sand (Freienwalder Sand, Wasserfassungsvermögen 21%) angefüllt und 1 Liter Nährlösung zugefügt [*A. Rippel* und *R. Meyer* (22)]: $CaHPO_4$ 4,0 g; K_2SO_4 3,0 g; $MgSO_4$ 1,5 g; $MgCl_2$ 0,2 g; $FeSO_4$ 0,1 g; dest. Wasser 1000 ccm; $p_H = 6{,}8$. Außerdem wurden noch 0,01 g $NaMoO_4$ und 0,2 g KNO_3 (27,7 mg N) zugesetzt.

In den Sand wurden je drei Objektträger je Gefäß in vertikaler Richtung eingegraben (für die Rhizosphärenuntersuchung nach der Aufwuchsplattenmethode), die Sandoberfläche mit schwarzem Papier überdeckt und dann im Autoklaven in zwei aufeinanderfolgenden Tagen bei 2,0 Atm. 4 Stunden sterilisiert. Die Maiskörner (Sorte Mahndorf) wurden zunächst oberflächlich mit 0,5% Bromwasser 20 Minuten sterilisiert, in feuchtem sterilem Sand zum Keimen gebracht und die kleinen Keimlinge vorsichtig in die sterilisierten Mitscherlichgefäße überpflanzt.

Tabelle I.

Versuch	g Trockensubstanz			mg N in Maispflanzen			mg N im Sand		N-Bilanz in mg
	Oberirdisch	Wurzel	Zusammen	Oberirdisch	Wurzel	Zusammen	Zu Beginn	Am Ende	
Unbeimpft (Kontrolle)	4,95	3,22	8,27	59,7	35,8	95,5	190,6*	98,7	+ 3,5
	4,15	3,63	7,78	52,5	43,7	96,2		97,4	+ 3,0
	3,92	3,55	7,47	51,5	40,4	91,9		106,9	+ 8,2
	4,38	4,20	8,58	52,8	40,4	92,8		98,2	+ 0,4
	4,26	3,39	7,65	54,6	39,5	94,1		97,4	+ 0,9
	4,03	3,20	7,23	53,7	39,1	92,8		96,4	− 0,6
Mittel:	4,28	3,55	7,83 ± 0,48	54,2	39,9	94,1	190,6	99,1	+ 2,6 ± 3,16**
Mit *Azotobacter* beimpft	4,08	4,05	8,13	52,8	45,3	97,3	190,6	115,1	+ 24,8
	4,10	3,80	7,90	52,4	42,6	95,0		112,1	+ 19,5
	4,95	4,55	9,50	56,7	44,2	100,9		92,4	+ 6,8
	3,40	2,90	6,30	44,7	32,2	76,9		124,1	+ 14,8
	3,88	3,00	6,88	47,0	33,6	80,6		116,0	+ 10,0
	4,05	3,60	7,65	58,0	49,8	107,8		102,8	+ 14,8
Mittel:	4,18	3,75	7,93 ± 1,10	51,8	41,4	93,2	190,6	110,4	+ 15,0 ± 6,01
Azotobacter + Mannit	—	—	—	—	—	—	87,3	140,4	+ 53,2

* In 7 kg Sand 87,3 mg N; in 12 Maiskörnern 75,6 mg N; zugesetzt 27,7 mg NO_3-N: zusammen 190,6 mg N. — ** Der mittlere Fehler nach der Formel $\sqrt{\frac{\Sigma v^2}{n-1}}$; die beimpften Gefäße enthalten 12,4 ± 2,76 mg N mehr als die Kontrolle.

Von zwölf Gefäßen wurden sechs mit je 2 ccm einer *Azotobacter*-Aufschwemmung (etwa 50 Millionen) beimpft. Hierzu wurde eine Reinkultur von *Azotobacter chroococcum* verwendet, von der in einem Vorversuch mit Mannit-Agar-Nährlösung nach *A. Rippel* (21) festgestellt war, daß sie eine gute N-Bindungsfähigkeit besitzt (12,2 mg N auf 1 g Mannit nach 8 Tagen). Die übrigen sechs Gefäße dienten als Kontrolle. Außerdem wurde ein unbepflanztes Gefäß mit *Azotobacter* geimpft und dazu noch 10 g Mannit zugefügt, um dadurch die Stickstoffbindung der Kultur im Sand mit gut verfügbarem Energiematerial zu ermitteln.

Die Gefäße wurden die erste Woche bei Zimmertemperatur, später im Gewächshaus gehalten und täglich mit dest. sterilem Wasser begossen. Der Versuch wurde nach 40 Tagen (am 16. VI.) abgebrochen, da die Maispflanzen schon deutliche Merkmale von Stickstoffmangel zeigten.

Um festzustellen, ob *Azotobacter* in den beimpften Gefäßen am Leben blieb, wurde in Abständen von je 10 Tagen mit dem Sand der bewachsenen Gefäße eine *Azotobacter*-Impfung auf Kieselsäuregallerte mit Ca-Lactat ausgeführt [*S. Winogradsky* (32)]. Noch nach

40 Tagen konnte man so die Entwicklung von *Azotobacter* fast in Reinkultur feststellen; die Sandimpfungen aus den Kontrollgefäßen blieben dagegen steril. (Da der Versuch nicht unter ganz sterilen Bedingungen ausgeführt werden konnte, fand eine geringe Infektion statt, die *Azotobacter*-Zellen waren aber so reichlich vorhanden, daß sie ohne Konkurrenz ihre Tätigkeit entfalten konnten.)

Nach 40 Tagen wurden die Maispflanzen geerntet und die Trockensubstanz der ober- und unterirdischen Teile (die letzteren unter Abziehung des beigemengten Sandes) wie auch der Gehalt an Stickstoff in Pflanzen (nach *Kjeldahl*) und im Sand (nach *Kjeldahl-Foerster*) bestimmt.

Die Ergebnisse mit N-Bilanz am Ende des Versuchs zeigt Tabelle I. Aus dem Vergleich zwischen den beimpften und den unbeimpften Gefäßen ergibt sich, daß im gesamten Pflanzenertrag kein Unterschied besteht; auch die Erträge der ober- und unterirdischen Teile zeigen nur geringe Unterschiede, was auch auf den von den Pflanzen assimilierten Stickstoff zutrifft. Aus den Zahlen für den im Sand am Ende des Versuchs gefundenen Stickstoff geht jedoch hervor, daß die geimpften Gefäße im Durchschnitt 11,3 mg N mehr als die Kontrollen enthalten, was sich auch in der N-Bilanz äußert. Doch sind die Schwankungen der einzelnen Parallelen groß, so daß der Schluß über einen Gewinn des Stickstoffs in beimpften Gefäßen kaum berechtigt ist. Im Gegensatz dazu konnten wir im Gefäß mit Mannit einen weit größeren N-Gewinn (gegenüber der Kontrolle 50,6 mg N) feststellen; auf 1 g Mannit bezogen fanden sich 5,06 mg aus der Luft gebundener Stickstoff.

Es ist anzunehmen, daß der mit KNO_3 und den Maiskörnern zugesetzte Stickstoff fast ganz von den Pflanzen aufgenommen wurde; nur 4,2 mg N davon sind im Substrat geblieben: es ist weniger wahrscheinlich, daß auch ein Teil vom Sandstickstoff (87,3 mg) absorbiert wurde. (Mit *Azotobacter*-Aufschwemmung zugesetzter N kommt hier nicht in Frage, er beträgt weniger als 0,1 mg N.) Damit in Einklang steht auch die Feststellung über das Aussehen der Maispflanzen am Versuchsende.

Den kleinen festgestellten N-Gewinn in geimpften Gefäßen müssen wir auf die Luftstickstoffbindung von *Azotobacter* zurückführen. Es spricht teilweise dafür auch die Bestimmung der *Azotobacter*-Zahl am Ende des Versuchs. Direkte mikroskopische Zählung nach *Winogradsky* ergab in Präparaten aus den geimpften Gefäßen 70000 Zellen, aus den Gefäßen mit Mannit 450000 Zellen in 1 g Sand, während anfänglich etwa 7000 *Azotobacter*-Zellen je g Sand zugesetzt wurden. (In den Petrischalen mit Mannit-Agar hatten sich nur winzige unregelmäßige Kolonien entwickelt; deswegen haben wir die Zahlen nach diesem Plattenverfahren nicht ausgewertet.) Es folgt daraus, daß eine Vermehrung von *Azotobacter* nicht nur im Gefäß mit Mannit stattfand — das entspricht auch der analytisch gut feststellbaren N-Bindung —,

sondern auch in den Gefäßen ohne Zusatz von Energiematerial. Da es kaum anzunehmen ist, daß die C-Quelle von den Spuren der organischen Substanz des Sandes stammt, die möglicherweise durch die Tätigkeit des Wurzelnetzes hätten aktiviert werden können, muß man die Vermehrung der *Azotobacter*-Zellen den Ausscheidungen der lebenden Wurzeln bzw. den teilweise schon abgestorbenen Wurzelteilen zuschreiben.

Eine teilweise Aufklärung gab weiter die Untersuchung der Wurzelhaare bzw. auch der dickeren Wurzelteile nach der Aufwuchsplattenmethode von *Cholodny* [s. *A. Hulpoi* (8); *R. Starkey* (25)]. Die ausgegrabenen Objektträger mit darauf festgeklebten Wurzelhaaren von Mais wurden an der Luft getrocknet, flamme- oder alkoholfixiert und mit 5 %igem Phenol-Erythrosin 30 Minuten gefärbt. Durch mikroskopische Kontrolle konnten wir keine Anhäufung, sogar nicht einmal vereinzeltes Vorkommen von *Azotobacter*-Zellen auf oder um die Wurzelhaare herum entdecken. Die in einigen Fällen um die Wurzelhaare beobachteten Stäbchen kann man auf etwaige Infektion zurückführen.



Abb. 1. Wurzeln von *Mais*, auf Ca-Lactat-Agar ausgelegt. Entwicklung von *Azotobacter*.

Es ist andererseits interessant, daß sich um die Wurzeln von Mais, die mit festgeklebtem Sand auf die Kieselsäuregallerte mit Ca-Lactat gelegt wurden, schon nach zwei Tagen ein weißer, schleimiger Überzug bildete, der sich als fast reine Anhäufung von *Azotobacter*-Zellen erwies (Abb. 1). Hieraus folgt also, daß sich *Azotobacter* in der Rhizosphäre von Mais befindet. Daß aber eine engere Beziehung mit den Wurzelhaaren, etwa im Sinne der Bakteriorhiza, nicht besteht, zeigen auch die Präparate, die nach einer modifizierten Methode von *Razumov* (20) hergestellt wurden und nach welcher die Objektträger mit festgeklebten Wurzelhaaren mit Mannit-Agar ohne N überdeckt, zwei Tage in feuchter Kammer bei 30° C bebrütet und dann getrocknet und mit Phenol-Erythrosin gefärbt wurden; in diesem Falle entwickelten sich keine *Azotobacter*-Kolonien oder Zellen um die Wurzelhaare.

Aus diesem allen folgt, daß sich *Azotobacter* in der Maisrhizosphäre befindet, daß er sich aber nicht auf den Wurzelhaaren ansiedelt. Für den endgültigen Effekt der eventuellen Tätigkeit von *Azotobacter* in der Rhizosphäre ist eine solche Bakteriorhiza auch nicht unbedingt nötig.

Der Einwand eines ungeeigneten Nährbodens für Mais kommt hier nicht in Frage, denn die Pflanzen entwickelten sich mit einer größeren N-Gabe gut, was aus der Entwicklung zweier Maispflanzen hervorging,

die unter sonst gleichen Bedingungen bei Zugabe von je 2,0 g KNO_3 gut vorwärtskamen. Ebenso zeigt die gute N-Bindung und die Vermehrung von *Azotobacter* im Gefäß mit Mannit, daß auch *Azotobacter*, wenn eine geeignete C-Quelle vorhanden ist, in diesem Boden günstige Entwicklungsbedingungen findet. Die Prüfung der Reaktion am Ende des Versuchs (p_H 6,3 bis 6,4) zeigte, daß auch nicht eine eventuelle Versäuerung des Substrats die geringen Unterschiede zwischen geimpften und nichtgeimpften Gefäßen erklären konnte.

III.

Um genauer das Vorkommen von *Azotobacter* in der Mais-Rhizosphäre zu prüfen, wurde ein Versuch mit kleineren Sandmengen unter absolut sterilen Bedingungen ausgeführt.

Der Versuch wurde insofern ausgedehnt, als zusammen mit *Azotobacter* auch andere Mikroorganismen in die Rhizosphäre des Mais eingebracht wurden, um auf diese Weise die Konkurrenzeinflüsse verschiedener Bodenmikroorganismen im Wurzelbereich zu prüfen. Außer *Mais* (Sorte Mahnfeld) wurde auch *Ackerbohne* (Sorte Wadsacks) untersucht.

In Rollflaschen von 750 ccm wurde je 0,5 kg Sand gefüllt und 100 ccm der Nährlösung zugesetzt (wie im ersten Versuch, aber ohne Stickstoff). Nach der zweimaligen Sterilisation bei 2,5 Atm. 45 Minuten wurden je zwei mit Bromwasser sterilisierte Körner je Gefäß zwischen zwei eingegrabene Objektträger eingesät. Nach der Keimung der Samen wurden je zwei Flaschen mit Aufschwemmung von *Azotobacter* allein bzw. mit folgenden Mikroorganismen zusammen beimpft:

Azotobacter chroococcum in Reinkultur;
Azotobacter + *Bact. fluorescens liquefaciens*;
Azotobacter + *aerobe Cellulosezersetzer* (Rohkultur);
Azotobacter + *Trichoderma viridis*;
Azotobacter + *Fusarium sp.*;
Azotobacter + Bodenaufschwemmung.

Alle diese Mikroorganismen wurden aus dem Boden isoliert. Als Kontrollen dienten bepflanzte und unbeimpfte bzw. unbepflanzte und beimpfte Rollflaschen.

Nach 18, bei dem Mais auch nach 5 Tagen, wurden die Wurzeln, ähnlich wie im ersten Versuch, nach der Aufwuchsplattenmethode (nach *Cholodny*) auf Objektträgern mit Mannit-Agar (nach *Razumov* modifiziert) und auf der Kieselsäuregallerte untersucht.

In der *Mais*-Rhizosphäre wurde folgendes festgestellt: Die Objektträger mit aufgeklebten Wurzelhaaren ergaben das gleiche Bild wie im Versuch mit *Mitscherlich*schen Gefäßen. *Azotobacter* konnte auch nach 18 Tagen mikroskopisch auf oder um die Wurzelhaare nicht festgestellt werden; eine Ausnahme bildeten jedoch die Präparate aus den Flaschen, in die *Azotobacter* zusammen mit *aeroben Cellulosezersetzern* geimpft

worden war. Hier findet man, wenn auch sehr selten, typische *Azotobacter*-Diplokokken um die Wurzeln herum. Andere Mikroorganismen entwickeln sich dagegen um die Wurzelhaare gut, was im Falle von *Bact. fluorescens* besonders deutlich erscheint. Pilzhyphen fanden sich wenig um die Wurzelhaare, sie entwickeln sich aber auch außerhalb der engeren Mais-Rhizosphäre; bei *Trichoderma* begegnet man z. B. typischen, auf den Objektträgern aufgeklebten Konidienträgern.

Die nach *Razumov* hergestellten Präparate und insbesondere die auf der Kieselsäuregallerte mit Ca-Lactat gelegten kleinen Wurzeln zeigen indessen, daß sich *Azotobacter* unter diesen, für sein Wachstum günstigen selektiven Bedingungen, entwickelt, wenn auch in allen Fällen nicht gleich intensiv. Die verschiedene Entwicklung unter diesen Bedingungen kann uns teilweise als Maßstab dienen, wieweit die verschiedenen Mikroorganismen die *Azotobacter*-Zellen aus der Mais-Rhizosphäre verdrängen können. So entwickeln sich z. B. auf der dünnen Agarschicht (Präparate nach *Razumov*) nach Einbringen einer Reinkultur von *Azotobacter* bzw. einer Mischkultur von diesem mit *Cellulosezersetzern* mehr Mikrokolonien des Stickstoffbinders, als in Kombination mit Pilzen oder mit Mikroorganismen aus der Bodenaufschwemmung. In Mannitpräparaten aus den Gefäßen, in die *Azotobacter* zusammen mit *Bact. fluorescens* eingebracht wurde, kam *Azotobacter* gar nicht zur Entwicklung. Auf der Kieselsäuregallerte entwickelte sich der Stickstoffbinder gut um die Wurzeln herum, sogar auch dann, wenn die Würzelchen vorher mit sterilem Wasser abgespült waren. Doch war der weiße, später braune, schleimige Überzug im Falle *Azotobacter* + Bodenaufschwemmung wenig dick. Auch nach dieser Methode konnte man feststellen, daß *Azotobacter* besonders durch *Bact. fluorescens* aus der Mais-Rhizosphäre verdrängt wird, da sich dieser auf den meisten Platten mit Kieselsäuregallerte nicht mehr um die Wurzeln entwickelte.

Dieser unter sterilen Bedingungen ausgeführte Versuch bestätigt also, was das Vorkommen von *Azotobacter* auf der Wurzeloberfläche betrifft, im allgemeinen die Befunde des ersten Versuchs. Er zeigt außerdem, daß sich andere Bodenmikroorganismen auf der Wurzeloberfläche leicht ansiedeln und den Stickstoffbinder aus der engeren Rhizosphäre verdrängen können. Am deutlichsten kommt das bei *Bact. fluorescens liquefaciens*, weniger bei den Pilzen vor, während die *aeroben Cellulosezersetzer* nicht verdrängend zu wirken scheinen (sichere Schlußfolgerungen sind jedoch nicht gestattet, da mit einer Anhäufungskultur von *Cytophaga* gearbeitet wurde). Daß *Azotobacter* dennoch in der weiteren Rhizosphäre bleibt, beweist sein Wachstum um die Wurzeln auf der Kieselsäuregallerte mit Ca-Lactat und auf der dünnen Mannit-Agarschicht. Jedenfalls besteht zwischen *Azotobacter* und den Mais-

wurzeln keine so enge Berührung, wie dies für andere Bodenmikroorganismen festgestellt werden konnte.

Die Prüfung dieser Konkurrenzverhältnisse in der Rhizosphäre der *Ackerbohne* ergab — unter sonst gleichen Versuchsbedingungen — ein ähnliches Bild.

Doch wurde in der Ackerbohne-Rhizosphäre im allgemeinen eine üppigere Vermehrung festgestellt. *Azotobacter*, in Reinkultur geimpft, fanden wir nach 18 Tagen nicht nur um die Wurzeln auf der Gallerte und auf dem Mannit-Agar, sondern, wenn auch selten, auf den im Sand eingegrabenen Objektträgern; hier treten einzelne *Azotobacter*-Zellen neben den Wurzeln auf, wurden aber niemals den Wurzelhaaren aufsitzend beobachtet. Auch in dem Falle, wo *Azotobacter* zusammen mit *Cellulosezersetzern* eingebracht wurde, findet man nach der Aufwuchsplattenmethode einige *Azotobacter*-Kokken um die Wurzeln. In anderen Kombinationen konnte auf den Objektträgern *Azotobacter* nicht festgestellt werden. Demgegenüber war die Entwicklung der Pilzhyphen in der Rhizosphäre der Ackerbohne reichlich und die kleinen Würzelchen oft stark mit Hyphen von *Trichoderma* verfilzt. Auf der Kieselsäure entwickelt sich jedoch der Stickstoffbinder nicht nur in Kombination mit Pilzen, sondern, wenn auch weniger intensiv, auch mit *Bact. fluorescens*, so daß auch dieses Bakterium nicht ganz *Azotobacter* aus der Ackerbohne-Rhizosphäre zu verdrängen imstande ist.

Schon nach den mikroskopischen Bildern der auf den Objektträger aufgeklebten Wurzeln können wir schließen, daß die Vermehrung von *Azotobacter* in der Rhizosphäre der *Ackerbohne* intensiver vor sich geht als in der Rhizosphäre des *Mais*. Dasselbe gilt auch für andere Mikroorganismen, wenn auch diese die *Azotobacter*-Kokken aus dem Wurzelbereich nicht so stark verdrängen, wie dies für den Mais festgestellt werden konnte. Es ist höchst wahrscheinlich, daß man diese Erscheinung auf die intensivere Wurzelausscheidung der Ackerbohne zurückführen kann. Zahlreiche Literaturangaben beweisen, daß die *Leguminosen* eine sehr üppige Mikroflora in ihrer Rhizosphäre anreichern.

IV.

Um noch deutlicher auf synthetische Weise diese Verhältnisse in der *Mais*- und *Ackerbohne*-Rhizosphäre zu demonstrieren, haben wir weiter die betreffenden Pflanzen steril auf den Nähragar kultiviert und die ausgewachsenen Keimlinge (bzw. auch die Samen) mit *Azotobacter* und anderen Mikroorganismen beimpft.

Erlenmeyerkolben von 100 ccm Inhalt wurden mit 80 ccm des Nährbodens folgender Zusammensetzung gefüllt: $CaHPO_4$ 0,05%; K_2HPO_4 0,025%; $MgSO_4$ 0,025%; KNO_3 0,005%; $FeSO_4$ 0,005%; Na_2MoO_4 0,0005%; gut gewässertes Agar 0,2%; p_H 6,8.

Auf diese Weise wurde ein Substrat von halbfester Konsistenz hergestellt, das ein gutes Wachstum des Wurzelnetzes, ebenso wie auch die nötige Diffusion der Wurzelausscheidungen bzw. der Mikroorganismenzellen zuläßt.

In den Hals der Erlenmeyerkolben wurde ein Reagensglas mit durchbohrtem Boden mittels Watte befestigt und so weit eingeschoben, daß die Röhre eben in den Nährboden eintauchte. Das Reagensglas wurde mit dem Wattepfropfen geschlossen und das Ganze im Autoklaven sterilisiert. Dann wurde auf dem Boden des Reagensglases je ein sterilisiertes Korn von *Mais-* bzw. *Ackerbohne* gelegt. In Berührung mit dem halbflüssigen Nährboden erfolgte bald die Keimung und die Wurzeln der Keimlinge wachsen durch das Loch der Röhre in das darunterliegende Agar hinein. Die als steril befundenen jungen Keimlinge wurden alsdann durch das Reagensglas



Abb. 2a.



Abb. 2b.

Abb. 2. a) *Azotobacter* um die Wurzel von *Mais*, in 0,2 %igem Agar kultiviert. Vergr. 250.
b) Ebenso, Vergr. 55. Zeigt die Abnahme von *Azotobacter* in größerer Entfernung von der Wurzel.

mit einigen Tropfen einer dichten Aufschwemmung von *Azotobacter* in Reinkultur wie auch zusammen mit *Bact. fluorescens, aeroben Cellulosezersetzern* und *Trichoderma viridis* beimpft.

Die Wurzeln wurden nach 10 bis 20 Tagen geprüft. Hier sei ein Beispiel aus dem Protokoll für den *Mais* erwähnt:

1. *Azotobacter chroococcum* allein:
   a) Präparate nach der Aufwuchsplattenmethode: Gute Entwicklung von *Azotobacter*; Zellen einzeln und in kleinen Anhäufungen um die Wurzeln und zwischen den Wurzelhaaren; in größerer Entfernung von der Wurzel abnehmend (Abb. 2a und 2b).
   b) Präparate nach *Razumov*: Große Zahl von Mikrokolonien von *Azotobacter* um die Wurzeln herum.
   c) Kieselsäuregallerte: Sehr gut entwickelter *Azotobacter*-Überzug um die Wurzeln.

2. *Azotobacter* + *Bact. fluorescens*:

a) Aufwuchsplattenmethode: Eine Menge von kleinen Stäbchen um die Wurzelhaare; *Azotobacter*-Diplokokken nur in einzelnen Fällen festgestellt.

b) Präparate nach *Razumov*: Zahlreiche Mikrokolonien von *Bact. fluorescens*, wenige von *Azotobacter*.

c) Kieselsäuregallerte: Schwächer gewachsener schmutziger Belag um die Wurzeln, bestehend aus *Azotobacter* und *Bact. fluorescens*.

d) Bouillon-Agar: Starke Fluoreszens; nur *Bact. fluorescens*.

3. *Azotobacter* + *Trichoderma viridis*:

a) Aufwuchsplattenmethode: Die Wurzelzone ist gut mit Pilzhyphen durchwachsen; *Azotobacter*-Kokken sehr selten.

b) Präparate nach *Razumov*: Neben Pilzmycel einige *Azotobacter*-Kolonien.

c) Kieselsäuregallerte: Mäßig entwickelter schleimiger Überzug; *Azotobacter*.

d) Würze-Agar: Nur der Pilz um die Wurzeln.

4. *Azotobacter* + *aerobe Cellulosezersetzer*:

a) Aufwuchsplattenmethode: *Azotobacter* wurde nicht gefunden; Pilzhyphen, kleine Kokken und Kurzstäbchen.

b) Präparate nach *Razumov*: Pilzhyphen; nur einige Mikrokolonien von *Azotobacter*.

c) Kieselsäuregallerte: Schwach entwickelter Belag um die Wurzeln herum. *Azotobacter* vermengt mit anderen Mikroorganismen.

Es folgt daraus, daß sich unter den angeführten Versuchsbedingungen *Azotobacter* doch im engeren Bereich der Wurzeln entwickelte. Makroskopisch läßt sich nur feststellen, daß das Agar um die Wurzeln etwas trüb wird; weiter entfernt von den Wurzeln findet im Agar kein Wachstum der Mikroorganismen statt. In diesem Zusammenhang ist die Feststellung von Bedeutung, daß andere Bodenmikroorganismen auch unter den vorliegenden Versuchsverhältnissen *Azotobacter* im höchsten Maße aus der *Mais*-Rhizosphäre verdrängen können. Auch die Cellulosezersetzer sind diesbezüglich den anderen Mikroorganismen gleichzustellen; dies darf man wahrscheinlich der stärkeren Entwicklung von Pilzen aus der Anhäufungskultur zuschreiben.

Bei der *Ackerbohne* liegen die Verhältnisse ähnlich. Wie im Sand wurde auch im Agar ein stärkeres Wachstum der Mikroorganismen festgestellt als in der Rhizosphäre des Mais. Dies folgt schon aus dem makroskopischen Aussehen der Kulturen, die ein charakteristisches Bild ergaben: das Agar um die Wurzeln ist trüb und in der oberflächlichen Agarschicht entwickelt sich *Azotobacter* in Form eines leicht sichtbaren Belages. *Azotobacter* konnte in großer Zahl zwischen den kurzen, gut färbbaren Wurzelhaaren festgestellt werden. Auch in Razumovpräparaten und auf der Kieselsäuregallerte ist die Entwicklung um die Wurzeln gut.

Die Vermehrung von *Bact. fluorescens* um die Wurzeln ist bei der Ackerbohne sehr intensiv, so daß die Wurzeloberfläche eine schleimige Beschaffenheit besitzt; aber auch das Wachstum von *Azotobacter* läßt sich bei gemeinsamem Einbringen mit *Bact. fluorescens* leicht, sowohl mit den direkten als auch mit den indirekten Methoden, feststellen. In diesem Falle ist die Entwicklung des Stickstoffbinders jedenfalls weniger gehemmt als im analogen Fall bei dem Mais. Für die Kombination von *Azotobacter* mit *Cellulosezersetzern* gilt für die Ackerbohne das gleiche wie für den Mais. *Azotobacter* war weiter auch durch *Trichoderma* weitgehend gehemmt. Der Pilz entwickelt sich gut, insbesondere auf der Agaroberfläche und sogar auf den Keimlingen, so daß das normale Anwachsen der jungen Pflanzen in den meisten Fällen verhindert war.

Es ist offensichtlich, daß die Wurzelausscheidung der Ackerbohne unter solchen Versuchsbedingungen sehr stark ist, worauf man u. a. auch aus dem Wachstum der Mikroorganismen in oberflächlicher Agarschicht schließen kann.

Wenn man endlich diese Ergebnisse mit jenen vergleicht, die in der Synthese von Wurzeln mit Mikroorganismen im Sand erzielt wurden, so sieht man, daß nach diesem Verfahren die Entwicklung von *Azotobacter* in Reinkultur auch in der unmittelbaren Rhizosphäre des Mais und nicht nur der Ackerbohne festgestellt werden kann. Aber auch hier war das Wachstum der anderen nicht stickstoffbindenden Mikroorganismen intensiver, so daß sie imstande sind, *Azotobacter* zu verdrängen.

V.

Bei der Besprechung dieser Ergebnisse können wir zunächst anführen, daß man gegen den angestellten Gefäßversuch einwenden könnte, daß er nicht den natürlichen Verhältnissen der Entwicklung von *Azotobacter* im Boden bzw. in der Rhizosphäre entspricht und außerdem, daß die Versuchsdauer zu kurz war.

Es ist ohne weiteres zuzugeben, daß die Verhältnisse in Mitscherlichgefäßen denen in der Natur nicht gleichen. Wir konnten aber feststellen, daß sich *Azotobacter* im Sande doch vermehrt, besonders unter Zusatz von geeignetem Energiematerial. Außerdem zeigte der Versuch mit Beimischen von anderen Mikroorganismen, daß sie eher hemmend als fördernd auf die Entwicklung von *Azotobacter* in der engeren Rhizosphäre wirkten.

Was die Kürze der Versuchsdauer betrifft, so muß man hier berücksichtigen, daß nach vielen Literaturangaben die Ausscheidung von Wurzelexkreten in der Periode des starken Vegetativwachstums am intensivsten ist, einer Zeit, in der auch die Zahl der Rhizosphäre-Mikro-

organismen die größte ist. Nach *N. Krasilnikov, A. Kris* und *M. Litvinov* (12) findet z. B. schon sehr früh ein Maximum in der Zahl der Mikroorganismen in der Mais-Rhizosphäre statt, was mit der starken Wurzeltätigkeit zusammenhängt. Am Anfang des Versuchs entwickelten sich die Maispflanzen gut und erst in den letzten 10 Tagen machten sich die N-Mangelmerkmale bemerkbar. Angesichts der Möglichkeit, daß *Azotobacter* erst mittelbar die Wurzelausscheidungen und abgestorbene Wurzelteile ausnutzt, könnte man annehmen, daß sich dieser Stickstoffbinder erst in dieser letzten Periode stärker entwickelte, nachdem das Wurzelsystem des Mais wegen des N-Mangels und schwächerer Assimilation zum Absterben von einzelnen Teilen neigte; den von *Azotobacter* fixierten Stickstoff konnten aber die Pflanzen nicht mehr ausnutzen. Auf diese Weise kann man eventuell den im Sande von geimpften Gefäßen gebliebenen Stickstoff erklären. Es konnte dabei die Möglichkeit eine Rolle spielen, daß zu Beginn des Versuchs die N-Bindungsfähigkeit von *Azotobacter* wegen des zugesetzten gebundenen Stickstoffs (KNO_3) geschwächt wurde, und erst später, nachdem der Nitrat-N durch die Wurzeln absorbiert war, sich entfalten konnte. Gegen diese Annahme spricht allerdings, daß dieser *Azotobacter*-Stamm im Gefäß mit Mannit in Gegenwart von KNO_3 gut Luftstickstoff bindet; doch liegen die Verhältnisse hier verschieden, weil im Mannit eine reichliche C-Quelle vorhanden ist. Obwohl also wahrscheinlicher ist, daß *Azotobacter* erst in den letzten Versuchstagen den Luftstickstoff stärker zu binden begann, ist kaum anzunehmen, daß sich die Pflanzen bei einer Versuchsverlängerung wieder erholen konnten.

Die Ergebnisse dieses Versuchs stehen im Gegensatz zu den ähnlich ausgeführten Versuchen der Autoren, die beim *Mais* mit *Azotobacter*-Impfung gute Ergebnisse erzielten. In der schon erwähnten Arbeit von *G. Truffaut* und *N. Bezssonoff* konnten die Autoren im Substrat ohne Stickstoff (der Sand enthielt jedoch 105 mg N auf 1 kg) große N-Gewinne am Ende des Versuchs feststellen; so z. B. in einem Falle 585,0 mg N auf 40,2 g Trockensubstanz, d. h. 14,5 mg N auf 1 g. Doch fanden sie in einem anderen Falle nur einen geringen Gewinn von 3,65 mg N auf 4,1 g Maissubstanz und auch die N-Bilanz in den Kontrollen war großen Schwankungen unterworfen, was die Autoren auf die Infektion zurückführen möchten. Da mit einer Mischung von Stickstoffbindern geimpft wurde, ist das Bild der *Azotobacter*-Tätigkeit weniger klar. Jedenfalls muß man annehmen, daß der Mais große Mengen von Wurzelexkreten ausgeschieden hat. Unter der Voraussetzung, daß sie nach ihrem energetischen Wert dem Mannit oder der Glucose entsprechen, wäre auf 1 g Trockensubstanz etwa 1 g von Wurzelexkreten ausgeschieden. Über die Menge und Zusammensetzung der Wurzelausscheidungen haben wir bis jetzt keine genauere Vorstellung; außerdem sind solche Unter-

suchungen hauptsächlich mit Wasserkulturen ausgeführt. *T. Lyon* und *J. Wilson* (15) fanden, daß die Menge der Wurzelausscheidungen nicht mehr als $^1/_{37}$ bis $^1/_{65}$ der organischen Pflanzensubstanz beträgt. Selbst wenn wir noch viel größere Mengen annehmen, so sind doch noch immer die Zahlen von *G. Truffaut* und *N. Bezssonoff* über den gebundenen Luftstickstoff auf Kosten von Wurzelausscheidungen kaum wahrscheinlich, sogar noch dann, wenn man einen Teil der C-Quelle den abgestorbenen Wurzelhaaren, abgelösten Epidermiszellen usw. zuschreiben wollte. Wie auch *R. Starkey* (24) anführt, ist es nicht wahrscheinlich, daß unter diesen Bedingungen die Stickstoffbinder den großen Bedarf der Nichtleguminosen an N decken können. Übrigens haben dieselben Autoren (31) später weniger befriedigende Ergebnisse mit Mais erhalten.

Von anderen Versuchen seien hier insbesondere die von *A. Šeloumova* erwähnt, da sie die Grundlage für die seit 1936 große Produktion des Präparats „Azotogen" (Reinkultur von *Az. chroococcum* im Torf) in Rußland gaben. In Vegetationsversuchen mit N-armem Boden (Sandpodsol) haben *A. Šeloumova* und *O. Protodjakonov* (25) für *Mais* und *Tabak* einen N-Gewinn in mit *Azotobacter* beimpften Gefäßen festgestellt, während die unbepflanzten Gefäße merkliche Verluste zeigten; es wurde daraus gefolgert, daß die Stickstoffbindung von *Azotobacter* nur in Verbindung mit Wurzelausscheidungen der Pflanzen zur Geltung kommt. Bei der Fortsetzung der Versuche (26) konnte man dann feststellen, daß sich *Azotobacter* in bezug auf die N-Bilanz verschieden verhält, und zwar nicht nur als Binder des elementaren Luftstickstoffs, sondern auch als Zersetzer des gebundenen Stickstoffs. In einer neulich erschienenen Arbeit (24) bringt die Autorin die Ergebnisse der Gefäßversuche im Sand unter sterilen Bedingungen, die ebenfalls die gute Wirkung des „Azotogens" zeigen sollen. So wurde für *Mais* ein N-Gewinn von 40 mg in mit *Azotobacter* geimpften Gefäßen festgestellt, der (schon nach 20 Tagen) ganz von den Pflanzen aufgenommen war. Die Versuchsreihe mit 62 mg NO_3/N zeigte, im Vergleich mit der Kontrolle, eine Ertragssteigerung von 4,45; 3,55 g Trockensubstanz und einen N-Gewinn von 41,9; 1,5 mg (zwei Parallelen). Größere N-Gaben (175 mg NO_3/N) wirkten hemmend auf die Luftstickstoffbindung; doch wurde hier in den geimpften Gefäßen ein kleinerer Ertrag als in der Kontrolle erzielt (3,25 : 4,0 g). Es ist weiter schwer zu erklären, daß kleinere Maiserträge mit größeren N-Gaben erzielt wurden, als mit kleineren Mengen aber in Kombination mit *Az. chroococcum*.

In unseren Versuchen haben wir ebenfalls einen N-Gewinn im Sand gefunden, der aber viel geringer war und sich nicht im Pflanzenertrag äußerte. Nach *A. Šeloumova* (24) kann man die Mißerfolge vieler

Autoren bei derartigen Versuchen hauptsächlich dadurch erklären, daß sie nicht die hemmende Wirkung des vorhandenen oder zugesetzten N, wie auch die Verschiedenheit der *Azotobacter*-Stämme berücksichtigten. Diese Einwände treffen aber auf unsere Versuchsbedingungen nicht zu. Es wurde nur 0,2 g KNO_3 (auf 7 kg Sand) zugesetzt, bei welcher Gabe (und zwar auf 2,8 kg Sand) *A. Šeloumova* eine günstige Wirkung fand; der verwendete *Azotobacter*-Stamm band bei Gegenwart von Mannit gut Luftstickstoff.

Andererseits konnten schon vor vier Jahrzehnten *Gerlach* und *Vogel* (3) in Gefäßversuchen mit natürlichen Böden keine günstige Wirkung der *Azotobacter*-Impfung auf den Ertrag von *Hafer*, *Senf* und *Möhren* finden, was sie auf die allgemeine Verbreitung der Stickstoffbinder in den Böden zurückführen. Es ist offensichtlich, daß man in Versuchen mit natürlichen Böden sehr verschiedene Ergebnisse erzielen kann, was nicht nur von dem Vorkommen von *Azotobacter* in bezüglichen Böden abhängt, sondern auch von vielen anderen Faktoren, von der Menge und Form des gebundenen Stickstoffs und nicht weniger von der Pflanzenart.

In bezug auf die so verschiedenen Ergebnisse ist es wichtig, daß man zunächst das Vorkommen von *Azotobacter* in der Rhizosphäre näher untersucht. In der Literatur finden wir über diese Frage nur wenige Angaben, wobei man die auseinandergehenden Ergebnisse einzelner Autoren teilweise auf die angewandten Methoden, teilweise auf die Auffassung des Begriffs von Rhizosphäre und Bakteriorhiza zurückführen kann. *N. Krasilnikov* (10) fand, daß sich *Azotobacter* in Wasserkulturen in der *Mais*-Rhizosphäre anfangs gut entwickelt, später aber verschwindet; mit der Verlangsamung der Entwicklung nimmt gleichzeitig auch die Größe der Zellen ab. Wie *R. Starkey* (28) anführt, ist *Azotobacter* noch in keinem Falle in so großer Zahl in der Rhizosphäre gefunden, daß man daraus auf eine größere Bedeutung des Stickstoffbinders für das Wachstum der höheren Pflanzen schließen könnte; er selbst fand nach *Cholodny*scher Methode sehr selten die *Azotobacter*-Zellen um die Wurzelhaare. Auch bei meinen im Sand durchgeführten Versuchen konnten nach der Aufwuchsplattenmethode auf den Wurzeln des *Mais* keine und im engeren Wurzelbereich der *Ackerbohne* nur vereinzelt *Azotobacter*-Kokken festgestellt werden. In Versuchen mit Agar wurde zwar eine gute Vermehrung von *Azotobacter* auch in der *Mais*-Rhizosphäre beobachtet, doch hat diese Möglichkeit mehr eine theoretische Bedeutung, da die Verhältnisse hier weitgehend unnatürliche waren. Aus den Angaben von *H. Poschenrieder* (19) können wir ebenfalls schließen, daß dieses „gewöhnliches, allgemein verbreitetes Wurzelbakterium“ doch öfter in der weiteren als in der engeren Rhizosphäre,

d. h. an den Wurzeln vorkommt. Das stimmt übrigens auch mit dem vorbesprochenen Nachweis von *Azotobacter* in der Rhizosphäre auf indirektem Wege (Präparate nach *Razumov*, Kieselsäuregallerte) überein. Die Ergebnisse von *R. Starkey* (27) über die Zahl der Stickstoffbinder und von *G. Gräf* (4) über die Stickstoffbindung in der Rhizosphäre verschiedener Pflanzen zeigen weiter, daß gegenüber dem benachbarten Boden keine wesentlichen Unterschiede bestehen.

Diese Literaturangaben stehen also im Einklang mit unserem Befunde, wonach *Azotobacter* in der *Mais*-Rhizosphäre vorkommt, an der Oberfläche der Wurzelhaare aber nicht nachweisbar ist. Er überläßt diesen Platz anderen Mikroorganismen. Es folgt übrigens aus den Untersuchungen von russischen Autoren [*N. Krasilnikov* (11); *A Rybalkina* (23)], daß mit bakterisierten Samen im Boden eingeführter *Azotobacter* schon nach 10 bis 15 Tagen aus der Rhizosphäre der Kulturpflanzen vollkommen verschwindet (Gefäß- und Feldversuche)

Im Einklang mit vielen Literaturangaben über das häufige Vorkommen von Bakterien aus der *Bact. fluorescens*-Gruppe (schon seit *L. Hiltner* und *Störmer* (7)] auf den Wurzeln, ergibt sich aus unserem Versuch, daß *Bact. fluorescens* die Wurzelhaare überdeckt (Präparate nach *Cholodny*) und *Azotobacter* aus der engeren Rhizosphäre im höchsten Maße verdrängt (Platten mit Ca-Lactat). Nach *N. Krasilnikov*, *A. Kris* und *M. Litvinov* (12) überwiegen in der Rhizosphäre von Kulturpflanzen weit nichtsporenbildende Bakterien, unter welchen die Fluoreszenten gut vertreten sind. Weiter hat *H. Poschenrieder* (19) festgestellt, daß am Ende der Vegetationsperiode, nachdem der *Azotobacter* aus der engeren Rhizosphäre verdrängt ist, in dieser die *Bact. fluorescens*-Gruppe erscheint. Es ist weiter interessant, daß *B. radiobacter* — ein anderer gewöhnlicher Begleiter von *Azotobacter* in Rohkulturen — in der Rhizosphäre bzw. auf der Wurzeloberfläche in sehr hoher Zahl gefunden wurde (u. a. auch *R. Starkey* (27); *G. Gräf* (4)]. Die vorliegenden Versuche mit anderen im Boden oft vorkommenden Mikroorganismen zeigten ebenfalls, daß diese sich viel leichter um die Wurzelhaare ansiedeln können als *Azotobacter*. Auch bei der *Ackerbohne*, wo die Entwicklung aller Mikroorganismen in Versuchen mit Sand und Agar im allgemeinen stärker war, sind diese Mikroorganismen imstande, *Azotobacter* weitgehend aus der Wurzeloberfläche zu verdrängen.

Diese Feststellungen, auch gestützt auf Literaturangaben, können uns die Rolle von *Azotobacter* im Wurzelbereich der Pflanzen teilweise erklären. Man kann annehmen, daß diese Mikroorganismen der Bakteriorhiza auf direktem Wege die Wurzelausscheidungen als Nahrung ausnutzen, während *Azotobacter* erst mittelbar, vielleicht durch diese Bakterien, über diese Energiequelle verfügt. Warum sich bei *Azotobacter* nicht eine so enge Berührung mit den Wurzelhaaren wie bei

anderen Mikroorganismen verwirklicht, ist schwer zu beantworten. Es ist dabei nicht ausgeschlossen, daß die Wurzelausscheidungen lösliche N-Verbindungen enthalten, die das unmittelbare Wachstum von *Azotobacter* verhindern, nicht aber das von anderen konkurrierenden Mikroorganismen. Den Einfluß der Reaktion können wir hier nicht abmessen; nach *C. Thom* und *H. Humfeld* (29) zeigt das Wurzelsystem von *Mais* in Böden verschiedener Reaktion eine ausgesprochene Tendenz, die Reaktion im neutralen Bereich (p_H 6,0 bis 7,5) zu halten, so daß die Reaktion eher fördernd als hemmend wirken dürfte. Es wäre jedenfalls von Interesse, die Beteiligung und Bedeutung von *Azotobacter* in diesen Auseinandersetzungen zwischen den Pflanzen und Mikroorganismen genauer zu untersuchen.

Das Problem der Energiequelle für *Azotobacter* im Boden bleibt noch immer ungelöst. Aus diesen Betrachtungen geht hervor, daß die Ernährung mit Ausscheidungen der lebenden Wurzelteile auf indirektem Wege viel wahrscheinlicher als auf direktem Wege ist. Daß sich *Azotobacter* mit Zwischenprodukten des Kohlenhydratabbaues ernähren kann, folgt u. a. auch aus den Untersuchungen von *S. Winogradsky* (32), der auf Grund dieser Tatsache die Ernährungsweise des Stickstoffbinders in natürlichen Verhältnissen im Boden zu erklären versuchte. Nach *O. Loew* (14) soll sich *Azotobacter* in humusarmen Böden hauptsächlich auf Kosten von absterbenden Wurzelhaaren ernähren. *N. Krasilnikov*, *A. Kris* und *M. Litvinov* (12), die in der Rhizosphäre (auch von *Mais*) eine beträchtliche Zahl von aeroben *Cellulosezersetzern* in der Periode des intensiven Vegetativwachstums fanden, meinen, daß sich die Mikroorganismen auch im Wurzelbereich der lebenden Pflanzen mehr auf Kosten von Abbauprodukten der abgestorbenen Wurzelteile entwickeln als von Wurzelausscheidungen. In diesem Falle könnte *Azotobacter* nur sekundär die pflanzlichen Nährstoffe auswerten, nämlich die Zersetzungsprodukte der Cellulose. Im Rahmen dieser Versuche sei auf die interessante Tatsache hingewiesen, daß man bei dem gemeinsamen Einbringen von *Azotobacter* und *aeroben Cellulosezersetzern* das Vorkommen des ersten auch nach der Aufwuchsplattenmethode feststellen kann. Auf irgendeine Förderung des *Azotobacter*-Wachstums durch Ausnutzung der durch Cellulosezersetzer angegriffenen abgestorbenen Wurzelhaare kann nur vorsichtig geschlossen werden, da die Lösung dieser Frage nur durch genauere Untersuchungen möglich ist.

Wir sehen also, daß manche Gründe dafür sprechen, daß *Azotobacter* die Produkte der lebenden bzw. abgestorbenen Wurzelteile erst vermittelst anderer, an die Lebensbedingungen der Rhizosphäre besser angepaßten, Mikroorganismen ausnutzt.

Das Vorkommen von *Azotobacter* in der Rhizosphäre bietet also noch viele offene Probleme. Was aber die Frage der Bodenimpfung

mit *Azotobacter* betrifft, so ist das direkte Einbringen dieses Luftstickstoffbinders offenbar von geringerem Wert als die Schaffung von günstigen Bedingungen für die Entwicklung der im Boden schon vorhandenen *Azotobacter*-Keime.

Zusammenfassung.

Im Sandversuch mit *Mais* war der Ertrag der Pflanzen in den mit *Azotobacter chroococcum* beimpften Gefäßen gleich dem Ertrag in der Kontrolle. Doch konnte man in beimpften Gefäßen am Ende des Versuchs (nach 40 Tagen) einen geringen N-Gewinn im Sand feststellen.

In geimpften Gefäßen wurde eine Vermehrung der *Azotobacter*-Zellen im Sande wie auch um die Wurzeln herum im geeigneten Substrat festgestellt. Die mikroskopische Untersuchung der eingegrabenen Objektträger zeigte jedoch, daß *Azotobacter* nicht auf den Wurzelhaaren erscheint.

Durch gesondert angestellte Versuche im Sand konnte man für *Mais* und *Ackerbohne* zeigen, daß sich andere *Bakterien* und *Pilze*, insbesondere *Bact. fluorescens liquefaciens* schnell auf den Wurzelhaaren ansiedeln und *Azotobacter* aus der engeren Rhizosphäre weitgehend verdrängen.

In Versuchen mit Agar fand sich *Azotobacter* jedoch unmittelbar um die Wurzeln herum, aber auch hier konnte eine gewisse Hemmung durch andere Bodenmikroorganismen beobachtet werden.

Es ist wahrscheinlich, daß dieser Stickstoffbinder die Produkte der lebenden und abgestorbenen Wurzelteile erst vermittelst anderer Mikroorganismen der Rhizosphäre ausnutzt.

Zum Schluß möchte ich Herrn Prof. *A. Rippel*, der mir die Anregung für die vorliegende Arbeit gab und deren Ausführung in seinem Institut ermöglichte, meinen besten Dank aussprechen.

Literatur.

1) *H. Amlong*, Deutsch. Landw. Presse **45**, 387, 1941. — 2) *A. Cauda*, Nuovo Giorn. Bot. Ital. **26**, 169, 1919 (zitiert nach *R. Starkey*, Soil Sci. **32**, 367, 1931, Angabe auf S. 386). — 3) *M. Gerlach* u. *J. Vogel*, Centralbl. f. Bakt. II, **9**, 881, 1902. — 4) *G. Gräf*, ebenda II, **82**, 44, 1930. — 5) *L. Hiltner*, Arb. d. Deutsch. Landw. Ges. **98**, 59, 1904. — 6) *Derselbe*, Mitt. d. Deutsch. Landw. Ges. **14**, 1915. — 7) *L. Hiltner* u. *K. Störmer*, Arb. d. biol. Abt. d. Gesundheitsamtes **3**, 445, 1926. — 8) *A. Hulpoi*, diese Zeitschr. **7**, 79, 1936. — 9) *S. Kostičev*, *A. Šeloumova* u. *O. Šuljgina*, Trudy Inst. s. h. mikrobiol. **1**, 5, 1926 (nach *N. Krasilnikov*, 12). — 10) *N. Krasilnikov*, Mikrobiologija **3**, 343, 1934. — 11) *Derselbe*, ebenda

8, 5, 523, 1939. – 12) *N. Krasilnikov, A. Kris* u. *M. Litvinov*, ebenda **5**, 270, 1936. – 13) *F. Löhnis*, Soil Sci. **22**, 253, 1926. – 14) *O. Loew*, Centralblatt f. Bakt. II, **70**, 36, 1927. – 15) *T. Lyon* u. *J. Wilson*, N. Y. (Cornell) Agr. Exp. Sta. Mem. **40**, 1921. – 16) *G. Naundorf*, Deutsch. Landw. Presse **47**, 427, 1940. – 17) *G. Petrenko*, Zap. Inst. zern. hoz. necernoz. pol. 1940 (Ref. Mikrobiologija **10**, 364, 1941). – 18) *H. Poschenrieder*, Centralbl. f. Bakt. II, **79**, 222, 1929. – 19) *Derselbe*, ebenda II, **80**, 369, 1930. – 20) *A. Razumov*, Mikrobiologija **2**, 346, 1933. – 21) *A. Rippel*, diese Zeitschr. **7**, 210, 1936. – 22) *A. Rippel* u. *R. Meyer*, Zeitschr. f. Bodenkde. u. Pflanzenernähr. A. **27**, 257, 1933. – 23) *A. Rybalkina*. Mikrobiologija **10**, 540, 1941 (Ref.). – 24) *A. Šeloumova*, Mikrobiologija **10**, 33, 1941. – 25) *A. Šeloumova* u. *O. Protodjakonov*, Trudy Inst. s. h. mikrobiol. **4**, 41, 1930 (Ref. Centralbl. f. Bakt. II, **91**, 306, 1934/35). – 26) *A. Šeloumova, E. Zaiceva* u. *V. Faerman-Nilov*, Trudy Inst. s. h. mikrobiol. **5**, 131, 1933 (Ref. Centralbl. f. Bakt. II, **91**, 306, 1934/35). – 27) *R. Starkey*, Soil Sci. **27**, 319, 355, 1929. – 28) *Derselbe*, ebenda **45**, 207, 1938. – 29) *C. Thom* u. *H. Humfeld*, Soil Sci. **34**, 29, 1932. – 30) *G. Truffaut* u. *N. Bezssonoff*, C. r. Soc. Biol. **91**, 1077, 1934. – 31) *Dieselben*, C. r. Acad. Science **182**, 663, 1926. – 32) *S. Winogradsky*, Ann. Inst. Pasteur **48**, 89, 1932.

(Aus dem Institut für physiologische Botanik der Universität Upsala.)

Über das Vorkommen von geographischen Rassen bei Crucibulum vulgare Tul.

Von

Nils Fries.

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 2. November 1942.)

In einer vor einigen Jahren durchgeführten Untersuchung über den zur Familie *Nidulariaceae* gehörenden Gasteromyceten *Cyathus striatus Pers.* wies ich nach (*Fries*, 1940), daß die der multipolaren Sexualität zugrunde liegenden Gene bei diesem Pilz in sehr wenigen multiplen Allelen auftreten. In der Diskussion des Untersuchungsergebnisses wurde u. a. auf die Möglichkeit hingewiesen, daß dieser Pilz infolge seiner aller Wahrscheinlichkeit nach zoochoren Verbreitungsweise Lokalrassen — im eigentlichen Sinne „geographische Rassen" — bilden könnte, von denen jede ihre bestimmte Allelenkombination der ebengenannten Gene besäße. Die Zahl der analysierten Fruchtkörper war jedoch damals viel zu gering, um überhaupt vermuten zu können, wie sich der Pilz wirklich in genannter Hinsicht verhielt. Nur eine gründliche Inventarisierung des Fruchtkörpermaterials innerhalb zweier (oder mehrerer) ziemlich begrenzter, doch weit voneinander getrennter Gebiete konnte hier etwas Klarheit schaffen.

Für eine derartige Untersuchung war indessen *Cyathus striatus* auf Grund seiner relativen Seltenheit offenbar ungeeignet. Doch hatte ich bereits früh gefunden, daß der systematisch sehr nahestehende *Crucibulum vulgare* sich hinsichtlich der multipolaren Sexualität auf die gleiche Weise wie *Cyathus striatus* zu verhalten schien. Da *Crucibulum vulgare* die am häufigsten vorkommende aller Nidulariaceen sein dürfte, beschloß ich statt dessen diesen Pilz zum Gegenstand einer Untersuchung genannter Art zu machen.

Infolge verschiedener Umstände zog sich diese im Jahre 1936 begonnene Arbeit über lange Zeit hin. Es zeigte sich u. a., daß gewisse Rassen von *Crucibulum vulgare* sehr schlecht in Kultur wachsen und darum viel Zeit und beträchtliche Geduld bei dem Mikroskopieren erfordern. Obwohl sich die hier veröffentlichten Ergebnisse auf die Analysen von nur 15 Fruchtkörpern gründen und im Hinblick auf das für die Untersuchung aufgestellte Ziel als präliminär anzusehen sind, dürften sie gleichwohl mancherlei an Interesse bieten.

Material und Methodik.

Die beiden Gebiete, in denen das Fruchtkörpermaterial der vorliegenden Untersuchung eingesammelt wurde, liegen im südlichen Schweden mit einem gegenseitigen Abstand von ungefähr 380 km (Abb. 1) und stimmen

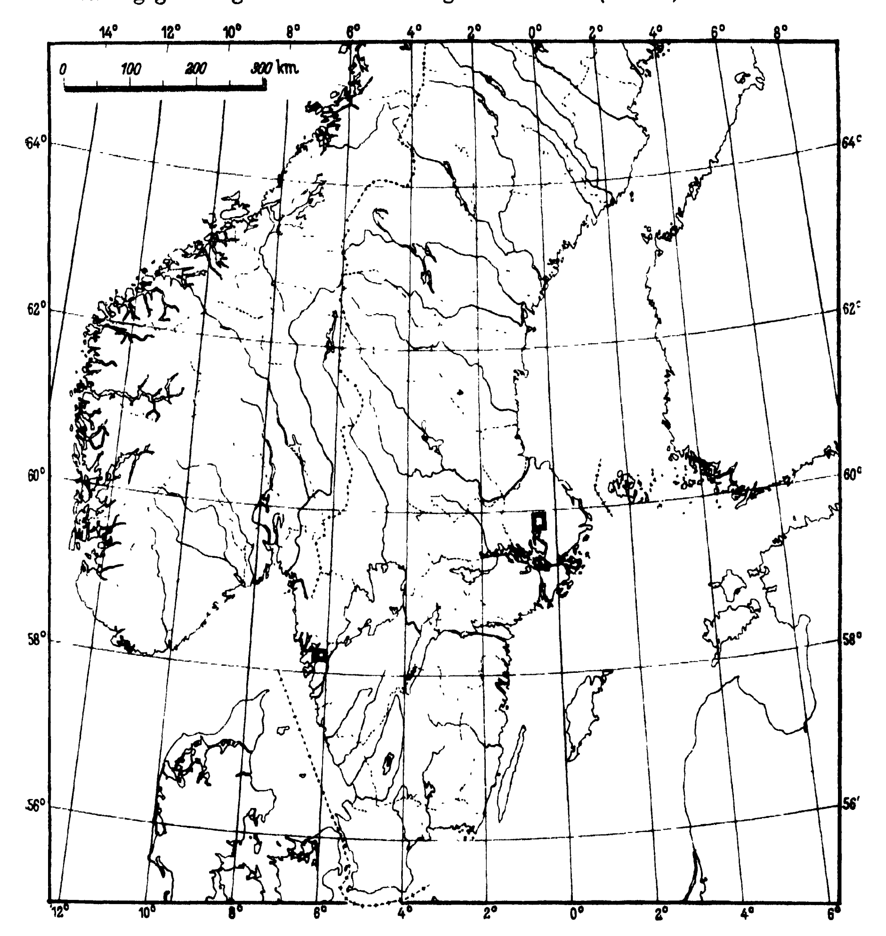


Abb. 1. Die Lage der beiden Untersuchungsgebiete.

der Lage und Größe nach in der Hauptsache mit den beiden Gebieten überein, die früher bezüglich der geographischen Rassen bei *Polyporus abietinus* (*Fries* und *Jonasson*, 1941) inventarisiert wurden. Das eine Gebiet liegt also unmittelbar südlich der Stadt Upsala, Provinz Uppland, und umfaßt eine Fläche von etwa 50 qkm (Abb. 2). Schon im Herbst 1936 begann ich Fruchtkörper von *Crucibulum vulgare* in diesem Gebiet zu analysieren. Das zweite Untersuchungsgebiet liegt südlich der Stadt Uddevalla, Provinz Bohuslän, an der schwedischen Westküste und nimmt eine Fläche von ungefähr 30 qkm ein (Abb. 3). Fruchtkörper aus diesem Gebiet wurden während der Jahre 1941/42 untersucht.

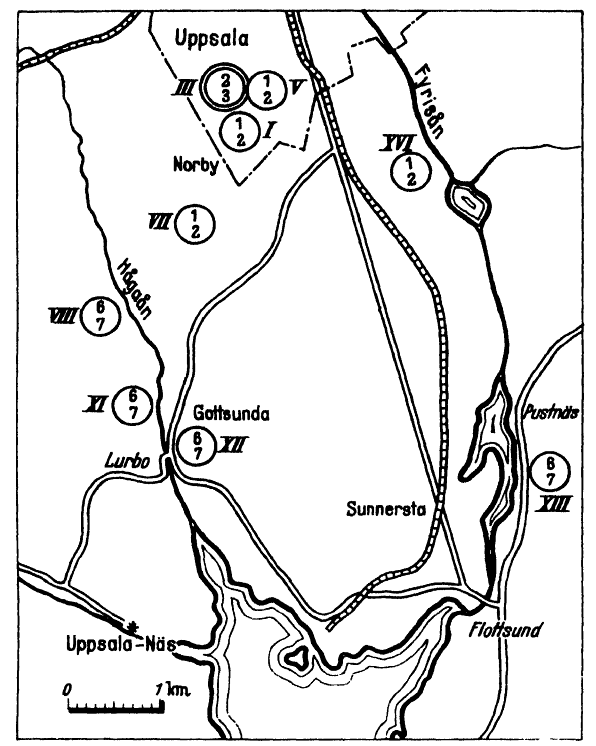


Abb. 2. Die Fundorte der untersuchten Fruchtkörper im östlichen Untersuchungsgebiet (bei Upsala). Ein einfacher Kreis bezeichnet, daß vom a-Faktor die Allelen $a_1 a_2$, ein doppelter bezeichnet, daß $a_2 a_3$ nachgewiesen wurden. Die Indexbezeichnungen der beim b-Faktor festgestellten Allelen werden durch die Ziffern in den Kreisen angegeben.

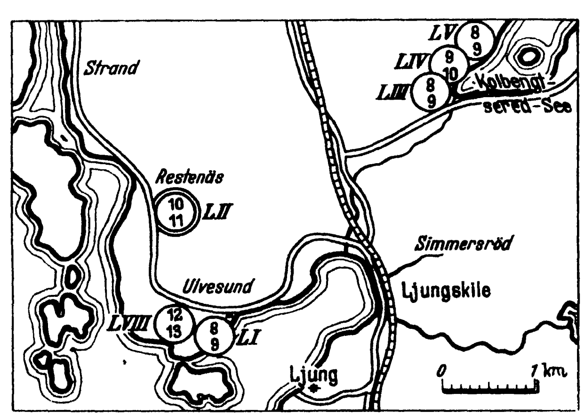


Abb. 3. Die Fundorte der untersuchten Fruchtkörper im westlichen Untersuchungsgebiet (bei Uddevalla). Erklärung wie bei Abb. 2.

Örtlichkeit und Zeit für das Einsammeln der verschiedenen Fruchtkörper gehen aus Tabelle I hervor.

Bezüglich der Untersuchungsmethodik sowie der im folgenden angewandten Bezeichnungsweise für Fruchtkörper, Einspormycelien usw. sei auf meine frühere Arbeit über *Cyathus striatus* verwiesen.

Tabelle 1. Zusammenstellung der Fundorte der analysierten Fruchtkörper von Crucibulum vulgare.

Nr. des Fruchtkörpers	Zeitpunkt des Einsammelns	Fundstelle	Substrat (immer auf dem Boden liegend)
		a) Untersuchungsgebiet bei Upsala.	
I	23. IX. 1936	Stadt Upsala, Stadtwald	Nadelholzspäne
III	4. X. 1936	,, ,, ,,	Lärchenzweige
V	4. X. 1936	,, ,, ,,	Birkenzweige
VII	8. XI. 1936	Kirchspiel Bondkyrka, Södra Norby	Birkenzweige
VIII	8. XI. 1936	,, ,, Fäbodarna	Fichtenzweige
XI	8. XI. 1936	,, ,, Lurbo	Fichtenzweige
XII	8. XI. 1936	,, ,, Gottsunda	Abgehauene Fichtenholzspäne
XIII	22. XI. 1936	,, Danmark, Pustnäs	Fichtenzweige
XVI	22. XI. 1936	,, Bondkyrka, Kungsängsbrücke	Kiefernzweige
		b) Untersuchungsgebiet bei Uddevalla.	
LI	13. VIII. 1941	Kirchspiel Resteröd, Ulvesund, Vindås	Plankenstück aus Nadelholz
LII	10. VIII 1941	,, ,, Restenäs	Tote Stengel von Nesseln und anderen Pflanzen
LIII	12. VIII. 1941	,, Ljung, Ausfluß des Kolbengtsered-Sees	Birkenzweige
LIV	12. VIII. 1941	,, Ljung, Westufer des Kolbengtsered-Sees	Verwelkte Farnwedel
LV	12. VIII. 1941	Wie LIV, aber mehr nördlich	An Land geschwemmtes Treibholz
LVIII	7. VIII. 1942	Kirchspiel Resteröd, Hof Ulvesund	Plankenstück von Nadelholz

Im Vergleich mit *Cyathus striatus* ist *Crucibulum vulgare* ein ziemlich schwerbearbeitbares Studienobjekt. Der Keimprozentsatz ist bei verschiedenen Fruchtkörpern unterschiedlich, dürfte jedoch im großen gesehen mit dem bei *Cyathus striatus* übereinstimmen. Dagegen bilden die Sporen gewisser Fruchtkörper von *Crucibulum vulgare* Einspormycelien ausschließlich von einem gewissen, hinsichtlich der Bearbeitung äußerst beschwerlichen Typ, der sich u. a. durch sehr langsames und unregelmäßiges Wachstum sowie kompaktes und zähes Hyphengewebe kennzeichnet. Eine sichere Feststellung des Vorkommens oder Fehlens von Schnallen in Kombinationskulturen mit derartigen Mycelien erfordert häufig ein langwieriges Mikroskopieren.

Die bei den Nidulariaceen in Peridiolen eingeschlossenen Sporen scheinen im allgemeinen ihre Keimfähigkeit mehrere Jahre lang zu bewahren, was ich u. a. bei *Cyathus striatus*, *Cy. olla* und *Nidularia farcta* feststellen konnte. Bei *Crucibulum vulgare* kann man noch nach 6 Jahren voll keimfähige

Sporen von Fruchtkörpern erhalten, die während dieser Zeit im Dunkeln bei Zimmertemperatur aufbewahrt wurden. Ein derartiges Verhalten kann bei einer Untersuchung dieser Art natürlich von großem Vorteil sein, da man hierdurch die Möglichkeit hat, neue Einspormycelien zu erhalten, beispielsweise als Ersatz für alte, degenerierte Testmycelien.

Kombinationsversuche.

Im Herbst 1936 wurden vollständige Sexualitätsanalyse für die neun Fruchtkörper aus dem Upsalagebiet durchgeführt. Bei sämtlichen ließ sich Tetrapolarität konstatieren. Durch gegenseitige Kombinationen, die auf die gleiche Weise wie bei *Cyathus striatus* durchgeführt wurden, stellte ich dann fest, welche Allelen für die verschiedenen Fruchtkörper gemeinsam waren. Ich halte es für überflüssig, innerhalb dieser Mitteilung die Kombinationsschemata wiederzugeben, die hierbei aufgestellt wurden. (Es besteht die Absicht, diese in Verbindung mit einer zukünftigen umfassenderen und abgerundeten Darstellung zu veröffentlichen.) In diesen Schemata und in den im folgenden erwähnten, die auf der Grundlage von einigen tausend analysierten Kombinationskulturen angefertigt worden sind, kommt keine einzige Unregelmäßigkeit vor, weder in Form von Durchbrechungskopulationen noch ausgebliebener Schnallenbildung. Die Schlüsse, die aus den Ergebnissen der Kombinationskulturen gezogen werden konnten, sind demnach völlig eindeutig und widersprechen einander nicht in einem einzigen Punkt.

Die Verteilung der Allelen auf die verschiedenen Fruchtkörper geht aus Tabelle II und Abb. 2 (S. 184) hervor. Wie ersichtlich, vertreten die neun untersuchten Fruchtkörper nur drei verschiedene Biotypen, nämlich $a_1a_2b_1b_2$ (Nr. I, V, VII und XVI), $a_1a_2b_6b_7$ (Nr. VIII,

Tabelle II. Übersicht der festgestellten Allelenkombinationen der Upsala-Fruchtkörper.

Nr. des Fruchtkörpers	Zifferbezeichnungen der Allelen			
	Faktor a		Faktor b *	
I	1	2	1	2
V	1	2	1	2
VII	1	2	1	2
XVI	1	2	1	2
VIII	1	2	6	7
XI	1	2	6	7
XII	1	2	6	7
XIII	1	2	6	7
III	3	2	3	2

* b_4 und b_5, die in diesem Schema nicht vorkommen, sind in einem Fruchtkörper (mit der Formel $a_1\ a_2\ b_4\ b_5$) von einem Fundort außerhalb der beiden hier untersuchten Gebiete nachgewiesen.

Tabelle III. Übersicht der festgestellten Allelenkombinationen der Uddevalla-Fruchtkörper.

Nr. des Fruchtkörpers	Zifferbezeichnungen der Allelen			
	Faktor a		Faktor b	
LI	1	2	8	9
LIII	1	2	8	9
LV	1	2	8	9
LIV	1	2	10	9
LII	3	2	10	11
LVIII	1	2	12	13

XI, XII und XIII) und $a_2a_3b_2b_3$ (Nr. III). Der Faktor a_2 ist in sämtlichen Fruchtkörpern enthalten, a_1 in allen außer in Fruchtkörper Nr. III, wo er durch a_3 ersetzt ist. Vom b-Faktor kommen fünf verschiedene Allelen vor, welche allerdings nur auf drei verschiedene Arten kombiniert auftreten, und zwar b_1b_2 (Nr. I, V, VII und XVI), b_6b_7 (Nr. VIII, XI, XII und XIII) und b_2b_3 (Nr. III).

Während der Sommermonate 1941 und 1942 wurden an sechs verschiedenen Standorten des Uddevallagebietes Fruchtkörper eingesammelt und anschließend analysiert. Es ergab sich hierbei, daß die Anzahl Allelen der „Sexualfaktoren" auch hier sehr begrenzt war. Bevor diese Allelen mit Bezeichnungen versehen werden konnten, mußten jedoch die isolierten Einspormycelien mit Upsala-Testmycelien kombiniert werden, da ja die Möglichkeit bestehen mochte, daß eine oder mehrere Allelen in Fruchtkörpern von beiden Gebieten vertreten sein konnten.

Nachdem die sehr umfangreichen Arbeiten des Kombinierens von Testmycelien aus den beiden Untersuchungsgebieten beendet worden waren, wurde das in Tabelle III wiedergegebene Schema über die Faktorenkombinationen der Uddevalla-Fruchtkörper als Ergebnis erzielt (vgl. auch Abb. 3, S. 184). Vergleicht man diese Fruchtkörper (LI bis LVI und LVIII) miteinander, so findet man, daß sie vier verschiedene Biotypen vertreten: $a_1a_2b_8b_9$ (Nr. LI, LIII und LV), $a_1a_2b_9b_{10}$ (Nr. LIV), $a_1a_2b_{12}b_{13}$ (Nr. LVIII) und $a_2a_3b_{10}b_{11}$ (Nr. LII). Der Faktor a_2 ist auch hier in sämtlichen Fruchtkörpern enthalten und a_1 in allen außer einem (Nr. LII), wo er durch a_3 ersetzt ist. Die b-Faktoren kommen in vier verschiedenen Kombinationen vor: b_8b_9 (Nr. LI, LIII und LV), b_9b_{10} (Nr. LIV), $b_{10}b_{11}$ (Nr. LII) und $b_{12}b_{13}$ (Nr. LVIII).

Vergleicht man die Upsala- und Uddevallastämme miteinander, ergibt sich also, daß dieselben drei Allelen des a-Faktors (und nur diese drei!) in den beiden Gruppen vertreten sind, während der b-Faktor in den zwei Untersuchungsgebieten durch völlig verschiedene Allelen (5 bzw. 6) repräsentiert ist.

Über einen gewissen Zusammenhang zwischen Habitus und „Sexualgenotyp".

Die Hunderte von isolierten Einspormycelien bilden hinsichtlich Aussehen, Wachstumsgeschwindigkeit usw. Vertreter der verschiedensten Typen. Bezüglich der von den Upsala-Fruchtkörpern isolierten Einspormycelien habe ich einen gewissen Zusammenhang zwischen Habitus und „Sexualgenotyp" festgestellt, ein recht interessantes Verhalten, das ich hier jedoch nur in Kürze berühren will, da es noch nicht ausreichend klargelegt worden ist.

Die Einspormycelien, die aus den zuerst untersuchten Fruchtkörpern (I bis V) erhalten wurden, vertraten den Myceltyp, der von

mir früher beschrieben wurde (*Fries*, 1936): rein weiß, reichlich luftmycelbildend sowie schnell und regelmäßig in vorwiegend radialer Richtung wachsend. Ich fand jedoch bald, daß dieser „Normaltyp" nicht durchgängig vorkam. So konnte ich aus den Fruchtkörpern VIII, XI, XII und XIII nur Einspormycelien eines vollkommen abweichenden Typs isolieren, das sich durch bedeutend langsameres Wachstum kennzeichnete und wenig oder gar kein Luftmycel bildete. Weiterhin war die Wachstumsweise nicht deutlich radial, sondern — wie eine mikroskopische Untersuchung zeigte — die äußerst reich verzweigten, dünnen Hyphen bildeten ein vollständiges Durcheinander ohne bestimmte Wachstumsrichtung. Die entstehenden Mycelien erhielten daher eine mehr oder weniger unregelmäßige Form.

Nachdem die Kombinationsversuche mit den Upsalastämmen beendet worden waren, zeigte es sich, daß der erstgenannte, „normale" Myceltyp sämtliche Einspormycelien auszeichnete, die von Fruchtkörpern mit den b-Faktoren b_1, b_2 und b_3 isoliert worden waren, während alle Einspormycelien von Fruchtkörpern mit den b-Faktoren b_6 und b_7 den letztgenannten Typ vertraten. Um einen genaueren Ausdruck des fraglichen Typunterschieds zu erhalten, wurde eine Anzahl Messungen der Wachstumsgeschwindigkeit bei 26 Testmycelien angestellt, von denen 15 die Faktoren b_1, b_2 und b_3 sowie 11 die Faktoren b_6 und b_7 repräsentierten. Für die ersteren wurde der Durchschnittswert $4{,}34 \pm 0{,}18$ mm je 24 Stunden und für die letzteren $1{,}50 \pm 0{,}31$ mm je 24 Stunden erhalten. Hierbei ist jedoch zu beachten, daß der Durchschnittswert für die letzteren nicht als besonders repräsentativ für den langsam wachsenden Typ als Gesamtheit zu betrachten ist, da die Testmycelien dieses Typs aus praktischen Gründen begreiflicherweise unter den schnellstwachsenden der isolierten Einspormycelien ausgewählt wurden. Der Unterschied in der Wachstumsgeschwindigkeit zwischen den beiden Typen dürfte deshalb in Wirklichkeit größer sein.

Es wäre von großem Interesse gewesen einen Fruchtkörper zu studieren, der sowohl einen der Faktoren b_1, b_2 oder b_3 und einen der Faktoren b_6 oder b_7 besessen hätte. Einen derartigen Fruchtkörper habe ich jedoch nicht in der Natur gefunden, und die durch Kombinationsversuche erhaltenen Diploidmycelien, die genannte Faktoren besaßen, bildeten ebensowenig wie andere Diploidmycelien in Kultur Fruchtkörper. Die einfachen Versuche, die ich bisher zwecks Erhaltung von Fruchtkörperbildung in Kultur unternommen habe, sind mißlungen, doch hoffe ich bei fortgesetzten Versuchen mehr Erfolg zu haben.

Diskussion.

Die Ergebnisse der Kombinationsversuche mit *Crucibulum vulgare* können in Kürze auf folgende Weise zusammengefaßt werden. Vom

Faktor *a* wurden nur drei Allelen festgestellt, die sämtlich innerhalb der beiden untersuchten Gebiete angetroffen wurden. Der Faktor *b* tritt dagegen in einer größeren Anzahl Allelen auf, insgesamt 11, und keine der 5 hiervon, die im Upsalagebiet wahrgenommen wurden, ist mit einer der 6 vom Uddevallagebiet identisch.

Diese Verhältnisse stimmen in gewissem Grade mit denen überein, die *Bauch* (1930, 1931) bei *Ustilago longissima* vorfand. In seinem umfangreichen Material aus Europa und Asien konnte *Bauch* bei dem genannten Pilz nur 8 Allelen des *a*-Faktors und 3 des *b*-Faktors nachweisen. Qualitative Verschiedenheiten zwischen den beiden Faktoren bezüglich der Wirkungsweise, wie sie *Bauch* bei *Ustilago longissima* fand, scheinen bei *Crucibulum vulgare* doch nicht vorzuliegen. Das Vorkommen einer identischen Allele, sei es vom *a*- oder *b*-Faktor, bei zwei kombinierten Einspormycelien von *Crucibulum vulgare* konnte augenscheinlich in sämtlichen untersuchten Fällen vollkommen Schnallenbildung verhindern, zum mindesten unter den Bedingungen, die angewandt wurden.

Bezüglich der geographischen Verbreitung der Allelen der *a*- und *b*-Faktoren verhält sich indessen *Crucibulum vulgare* auf eine völlig andere Weise als *Ustilago longissima* und übrigens alle anderen in dieser Hinsicht untersuchten Pilze. Während die drei Allelen des *a*-Faktors offenkundig allgemeiner verbreitet sind, treten die verschiedenen Allelen des *b*-Faktors sichtlich in voneinander wenigstens teilweise getrennten Gebieten auf. Wie groß diese Gebiete sind und wie scharf sich die Grenzen zwischen ihnen ziehen lassen, darüber ist eine Äußerung bisher noch unmöglich. Der Umstand, daß keine der Allelen des *b*-Faktors vom Upsalagebiet im Uddevallagebiet angetroffen wurde oder umgekehrt, scheint mir darauf hinzudeuten, daß erstens die Verbreitungsmöglichkeiten des Pilzes relativ begrenzt sind und zweitens sich die fraglichen Allelen durch eine ungewöhnliche Stabilität auszeichnen [im Vergleich mit z. B. *Schizophyllum commune* (*Kniep*, 1920) u. a.].

Nach allem zu schließen ist *Crucibulum vulgare* eine zoochore Art, und die Peridiolen dürften die Diasporen vertreten (vgl. *Gäumann*, 1926, S. 554). Ein freies Kombinieren von Einspormycelien verschiedener Fruchtkörper kommt bei *Crucibulum vulgare* sicher in bedeutend geringerer Ausdehnung vor als bei Pilzen im allgemeinen, wo die Sporen die Verbreitungseinheiten bilden. Nimmt man bei *Crucibulum vulgare* „Selbstbefruchtung" als das normale an, so wird das in Tabelle II zu beobachtende Verhältnis erklärlich, nämlich daß innerhalb eines kleineren Gebiets nur gewisse Biotypen vertreten sind, in diesem Falle u. a. $a_1a_2b_1b_2$ und $a_1a_2b_6b_7$ (doch nicht z. B. $a_1a_2b_1b_6$ oder $a_1a_2b_2b_7$). Eine typische Anemochore, die hierbei als Vergleichsobjekt geeignet ist,

bildet *Polyporus abietinus* (*Fries* und *Jonasson*, 1941), bei dem das Vorkommen von geographischen Rassen in den gleichen Gebieten wie bei *Crucibulum vulgare* untersucht wurde, doch mit in wesentlichen Punkten abweichendem Ergebnis.

Zusammenfassung.

1. 15 Fruchtkörper von *Crucibulum vulgare* — 9 aus einem Gebiet bei Upsala (Ostschweden) und 6 aus einem Gebiet bei Uddevalla (Westschweden) — wurden zum Gegenstand von Sexualitätsanalysen gemacht. In sämtlichen Fällen wurde tetrapolare Geschlechtsverteilung festgestellt.

2. Durch umfassende Kombinationsversuche mit Testmycelien von verschiedenen Fruchtkörpern wurde das Vorkommen gemeinsamer Allelen bei den Genen konstatiert, die die Tetrapolarität bedingen. Insgesamt wurden vom *a*-Faktor 3 Allelen nachgewiesen, die sämtlich in beiden Untersuchungsgebieten angetroffen wurden, sowie vom *b*-Faktor 11 Allelen, und unter diesen war keine der 5, die im Upsalagebiet festgestellt wurden, identisch mit einer der 6 vom Uddevallagebiet.

3. Gewisse Genotypen (z. B. $a_1a_2b_1b_2$ und $a_1a_2b_6b_7$ von Upsala und $a_1a_2b_8b_9$ von Uddevalla) wurden durch Fruchtkörper von mehreren verschiedenen Standorten vertreten.

4. Alle Einspormycelien, die aus Fruchtkörpern des Upsalagebiets isoliert wurden, konnten auf zwei Gruppen verteilt werden, die teils durch verschiedene Allelen des *b*-Faktors und teils durch Unterschiede bezüglich Habitus und Wachstumsgeschwindigkeit voneinander getrennt sind. Die eine Gruppe umschließt Einspormycelien mit den *b*-Faktoren b_1, b_2 oder b_3 und zeichnete sich durch schnelles und regelmäßiges Wachstum aus, während die andere Gruppe Einspormycelien mit den *b*-Faktoren b_6 oder b_7 umfaßt und sich durch langsames und unregelmäßiges Wachstum hervorhob.

5. Die für *Crucibulum vulgare* kennzeichnende, eigenartige Gestaltung der multipolaren Sexualität konnte möglicherweise so gedeutet werden, daß sie teils durch eine ungewöhnliche Stabilität bei den Allelen der Gene bedingt ist, die der genannten Erscheinung zugrunde liegen, und teils durch die wahrscheinlich zoochore Verbreitungsweise des Pilzes.

Literatur.

R. Bauch, Arch. f. Protistenk. **70**, 417, 1930. — *Derselbe*, ebenda **75**, 101, 1931. — *N. Fries*, Bot. Notiser 1936, S. 567. — *Derselbe*, Symb. Bot. Upsal. IV: 1, 1940. — *N. Fries* u. *L. Jonasson*, Svensk Bot. Tidskr. **35**, 177, 1941. — *E. Gäumann*, Vergleichende Morphologie der Pilze. Jena 1926. — *H. Kniep*, Zeitschr. f. ind. Abst.- u. Vererbungsl. **31**, 169, 1923.

Beobachtungen über die Lebensdauer von Pilzkulturen.

Von

K. H. Zobl, Wien.

(Eingegangen am 21. Dezember 1942.)

Vereinzelt finden sich in der Literatur Angaben über die Lebensdauer bestimmter *Pilze*, meist als gelegentliche Bemerkungen. Für einige technisch wichtige *Hefen* gibt es genauere Hinweise, die sich aber mehr auf die Lebensdauer von nach bestimmten Methoden behandelten und aufbewahrten Dauerkulturen beziehen. Nur in einer Arbeit von *C. Wehmer* (1) werden über die Lebensfähigkeit einiger eingetrockneter Pilzkulturen nähere Angaben gemacht. Es ist daher nicht unangebracht, langjährige Beobachtungen über die Lebensdauer von nach keiner besonderen Methode angelegten und aufbewahrten Pilzkulturen mitzuteilen, da sie besonders dem, der Pilzsammlungen zu betreuen hat, nützlich sein könnten.

Es wurde versucht, die weit in der Literatur verstreuten und oft schwer zugänglichen Bemerkungen über die Lebensdauer von Pilzen zu sammeln, wobei allerdings eine vollständige Erfassung aller Zitate nicht erreicht werden konnte. Die meisten Angaben liegen Jahrzehnte zurück und sind, soweit sie für die Zeit vor 1880 gelten, wenig sicher, da Kulturmethoden zu dieser Zeit erst vereinzelt angewendet wurden.

Von *Eidam* (2) wird angegeben, daß *Aspergillus fumigatus* nach 10 Jahren noch lebensfähig sei. Er hat 1873 Rasen von *Aspergillus fumigatus* getrocknet und im Herbar aufbewahrt, 1883 keimten Sporen dieses Rasens nach Aussaat wieder aus. Er macht diese Angaben auf S. 397 seiner Arbeit in einer Fußnote. Diese Angabe wird auch von *de Bary* (3) und später von anderen übernommen [1]. *C. Wehmer* (1a) findet die Angabe *Eidam*s nicht zutreffend. Nach ihm stirbt *Aspergillus fumigatus* wesentlich früher völlig ab.

De Bary (3) gibt an, daß geschützt und trocken aufbewahrte Kulturen von *Penicillium glaucum* noch nach 2 Jahren, *Aspergillus niger* nach über 1 Jahr, *Mucor stolonifer (Rh. nigricans)* nach 1 Jahr, *Botrytis Bassii* nach 1 bis 2 Jahren und *Sordaria curvula* noch nach 28 Monaten lebensfähig waren. Für *Phycomyces nitens* gibt *de Bary* an, daß er nach 10 Monaten abstirbt, während *van Tieghem* (4) die Erfahrung machte, daß *Phycomyces nitens* kaum länger als 3 Monate lebensfähig bleibt.

Hansen (5, 5a) gibt an, daß Sporen von *Coprinus Rostrupianus* noch nach 2 Jahren 4 Monaten keimfähig waren, wenn sie vom Schleim des

---

[1] Übrigens stimmt in *de Bary*s Zitat die Seitenzahl der Arbeit *Eidam*s nicht, da S. 347 angegeben wird, die Bemerkung sich aber auf S. 397 in einer Fußnote findet.

Hutes umgeben, zwischen Filtrierpapier bei Zimmertemperatur aufbewahrt wurden.

Nach demselben Autor war *Coprinus stercorarius* an der Luft liegend nach 7 Monaten abgestorben, dagegen blieb die Keimfähigkeit des gleichen Pilzes 16, 19, ja sogar 42 Monate erhalten, wenn er in Filtrierpapier verpackt, bei Zimmertemperatur aufbewahrt wurde.

Anixiopsis stercoraria, den *E. Chr. Hansen* 1874 auffand, war nach seiner Angabe noch nach 21 Jahren lebensfähig, die Sporen keimten mit Leichtigkeit auf Würzegelatine aus.

Ebenso fand *Hansen Mucor racemosus, Mucor erectus, Mucor mucedo, Aspergillus niger* noch nach 6 Jahren keimfähig, *Aspergillus flavescens (Aspergillus flavus)* nach 8 Jahren und *Aspergillus glaucus* noch nach 16 Jahren. Es wird allerdings nicht angegeben, wie diese Pilze kultiviert und aufbewahrt wurden.

Brefeld (6) gibt als Grenze der Lebensfähigkeit für *Coprinus stercorarius* 1 Jahr, für *Aspergillus flavus* 6 Jahre an.

Hoffmann (7) gibt an, daß *Mucor stolonifer (Rh. nigricans)* nicht zu feucht und nicht zu trocken aufbewahrt „ein bis mehrere Jahre keimfähig bleibt“. Nach *Zimmermann* (8) keimt dieser Pilz schon nach $1^1/_2$ Jahren nur mehr sehr schwer aus. *Mucor racemosus* war nach 6 Monaten nicht mehr keimfähig, ebenso ist *Mucor mucedo* sehr empfindlich gegen Austrocknung.

Von erstaunlicher Lebensdauer erwiesen sich, nach Angaben von *Hoffmann* (7) und von *v. Liebenberg* (9) Sporen gewisser *Rost-* und *Brandpilze. Hoffmann* trocknete Sporenmaterial an der Luft und bewahrte es in Papier eingeschlagen auf. *Uredo destruens Schlechtendal* keimte noch nach 4 Jahren, *Uredo segetum Pers.* nach 2 Jahren 7 Monaten, *Uredo Maydis* nach 3 Jahren 6 Monaten. *v. Liebenberg* findet die Keimfähigkeit seines Herbarmaterials noch wesentlich länger erhalten. So keimten *Tilletia caries* nach $8^1/_2$ Jahren, *Ustilago carbo* nach $7^1/_2$ Jahren, *Ustilago Tulasnei* und *Urocystis occulta* nach $6^1/_2$ Jahren, *Ustilago Kolaczekii, U. Crameri* und *U. destruens* nach $5^1/_2$ Jahren und *Ustilago Rabenhorstiana* noch nach $3^1/_2$ Jahren.

Besondere Beachtung verdienen auch die Angaben von *Acosta* (10) und *Berestneff* (11) über die Lebensfähigkeit von *Actinomyceten. Acosta* gibt an, daß er ausgetrocknete Kulturen von *Actinomyces invulnerabilis* noch nach 8 Jahren lebensfähig fand. *Berestneff* brachte am 1. Juli 1896 *Actinomyces violaceus* auf eine befeuchtete, bei 120° sterilisierte Roggenähre, verschloß nach Angehen dieses Pilzes das Kulturröhrchen mit einer Gummikappe und bewahrte es im Dunkeln bei Zimmertemperatur auf. Am 15. Oktober 1906 überimpfte er auf Bouillonagar und erzielte üppiges Wachstum. Der Pilz hatte damit 10 Jahre seine Lebensfähigkeit bewahrt.

F. Siebenmann (12) gibt in seiner Arbeit „Die Schimmelmycosen des menschlichen Ohres“ an, daß 5 Jahre alte Köpfchen von *Aspergillus niger* und *Aspergillus flavus* ausgesät, wieder keimten, *Aspergillus clavatus* dagegen nicht.

Bemerkenswert sind ferner die Angaben über die Langlebigkeit der für pathogen geltenden *Sproßpilze.* Darüber besitzen wir Angaben mehrerer Untersucher. *Busse* (13) gibt an, daß seine pathogene *Hefe* noch nach $2^3/_4$ Jahren ohne Schwierigkeiten anging, obwohl die Kulturen völlig eingetrocknet waren. Eine am 16. August 1894 angelegte Kultur seiner Hefe keimte noch am 2. April 1897. Dies findet *Busse* beachtenswert, da die

lange Lebensfähigkeit bei der Abwägung der Gefährlichkeit dieser Hefen recht erheblich ins Gewicht fällt.

Hohes Lebensalter erreichen Sproßpilze, die entweder in 10%iger Saccharoselösung oder auf Watte angetrocknet in zugeschmolzenem *Freudenreich*-Kölbchen aufbewahrt werden. *R. Meissner* (14, 14a) bewahrte 12 Stämme verschiedener *Weinhefen* in 10%iger Saccharoselösung auf und fand keine Schädigung. Nach 13 Jahren waren alle Stämme noch lebensfähig und gärkräftig. *A. Klöcker* (15) berichtet, daß er selbst nach mehr als 30 Jahren verschiedene *Hefen* lebend auffand. *H. Wille* (16a, b) verdanken wir ausführliche Angaben über die Lebensdauer technisch wichtiger *Hefen* und über die Anlage von Dauerkulturen. *A. R. Ling* und *D. R. Nanij* (17, 17a) fanden sporenbildende *Sproßpilze*, die an Watte angetrocknet waren und sich in zugeschmolzenen *Freudenreich*-Kölbchen befanden nach 34 Jahren vermehrungsfähig. *Plaut* (18) teilt mit, daß Gonidien (Chlamydosporen) von *Monilia candida* zwischen Fließpapier aufbewahrt 10 Jahre 9 Monate lang lebensfähig blieben.

C. Wehmer (1) verdanken wir mehrfach Angaben über die Lebensdauer eingetrockneter Pilzkulturen. Er bewahrte die Pilze in Form von Reagensglaskulturen mit Watteverschluß bei Zimmertemperatur auf. Als Nährboden verwendete er Würze und Zuckerlösungen. Nach $2^1/_2$ Jahren keimten ohne weiteres nach Aussaat mit der Platinöse *Aspergillus oryzae (Ahlbg.)*, *Aspergillus flavus (Link)*, *Aspergillus Wentii (Wehmer)*, *Aspergillus giganteus*, *Aspergillus minimus Wehmer*, *Citromyces Pfefferianus Wehmer*, ebenso *Mucor Rouxii (Calm.) Wehmer* und *Mucor javanicus Wehmer*.

Ohne Ergebnis blieb vorerst die Abimpfung von *Asp. clavatusDesmaz.*, *Asp. penicilliopsis Racib.*, *Asp. ostianus Wehmer*, *Asp. candidus (Link?) Wehm.*, *Monascus purpureus Went*, *Mucor piriformis A. Fischer*, *M. rhizopodiformis Cohn*, *M. corymbifer Cohn*, *Rhizopus oryzae Went* und *Pr. Geerl.*, *Penicillium luteum Zukal*, *Mucor hiemalis Wehmer*, *Phycomyces nitens Ag.*, *Thamnidium elegans*, *Saccharomyces Marxianus Hans.* und *Saccharomyces Logos Lindner*.

Aspergillus niger (Cram.) van Tiegh. und *Aspergillus fumigatus Fres.* waren durch paraffinierte Watteverschlüsse vor dem Austrocknen geschützt und wuchsen langsam zu neuem Mycel heran. Nach *Wehmer* sterben Konidien von *Aspergillus niger* trocken aufbewahrt schon nach kaum 1 Jahr. *Wehmer* steht in Gegensatz zu *Siebenmann*, er kann weiters auch die Angaben von *Eidam*, *Hansen*, *Brefeld* nicht bestätigen. Die Sporen von *Mucor hiemalis Wehmer* verlieren ihre Keimfähigkeit nach *Wehmer* (1b) unter 1 Jahr, während gleich alte submerse oder auch getrocknete Mycelien wohl auf Grund der Chlamydosporen auskeimten.

Die anscheinend toten Kulturen übergoß *Wehmer* mit steriler Nährlösung. Dabei konnte er neue Vegetation bei *Asp. clavatus*, *Asp. penicilliopsis*, *Mucor piriformis*, *M. rhizopodiformis*, *Rhizopus oryzae* und *Monascus purpureus* erzielen. Die übrigen Kulturen waren abgestorben. *Lendner* (19) verdanken wir einige Beobachtungen über *Mucorineae*. Er fand, daß Sporen von *Cunninghamella elegans* nach 2 Monaten, solche von *Mucor mucedo*, *Mucor spinosus*, *Sporodinia grandis*, *Rhizopus nigricans* nach 3 Monaten, Sporen von *Rhizopus arrhizus*, *Pirella circinans* nach 4 bis 6 Monaten, Sporen von *M. hiemalis*, *Rhizopus Cambodja*, *Thamnidium elegans*, *Chaetostylum Fresenii* nach 8 Monaten und Sporen von *Mucor Prainii* nach 10 Monaten nicht mehr keimten.

Mucor racemosus, *M. Rouxianus*, *Circinella aspera* und *Circinella minor* waren nach 10 Monaten noch keimfähig.

Eigene Beobachtungen.

Unsere Beobachtungen beziehen sich auf Kulturen unserer Pilzsammlung und damit auf eine größere Zahl von *Mucorineae*, *Ascomyceten*, einige *Basidiomyceten* sowie *Fungi imperfecti*. Die Pilze liegen in Reinkultur vor, sind genau bestimmt und in kürzeren Zeiträumen auf ihre Identität nachuntersucht. Sämtliche Kulturen sind in Röhrchen meist 16/16 abgeimpft und mit Zellstoffstopfen verschlossen. Über die Watteverschlüsse sind passende, ziemlich eng anliegende Glaskappen gestülpt, so daß die Austrocknung der Kulturen nur langsam stattfindet. Auch wird dadurch eine Infektionsgefahr der Kulturen stark herabgesetzt. Die Kulturen stehen bis zur Ausbildung einer kräftigen Vegetation im Halbdunkel, dann werden sie in Pappschachteln mit übergreifendem Deckel bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Da die Kulturen, besonders der gleichen Gruppen, zum selben Termin abgeimpft, unter denselben Bedingungen und auf den gleichen Nährböden gewachsen sind, ergibt sich dadurch eine gute Vergleichsmöglichkeit. Alle Kulturen wurden am gleichen oder folgenden Tag abgeimpft. Die Tabelle I ergibt das Verhalten aller *Mucorineae* nach der am gleichen Tage stattgefundenen Abimpfung.

Es zeigte sich, daß kaum $^1/_3$ der Kulturen ohne Schwierigkeit auskeimten. Die nicht angegangenen, anscheinend toten *Mucor*-Kulturen wurden daraufhin mit Nährlösung (Hefeabkochung mit 3 % Maltose) so übergossen, daß sie eben mit Flüssigkeit bedeckt waren. Um eine Verunreinigung der Kulturen zu vermeiden, wurden die Zellstoffstopfen abgesengt und das Überschichten mittels sterilem Abfülltrichter vorgenommen. Infektionen lassen sich auf diese Weise bei sorgfältiger Arbeit mit großer Sicherheit verhindern.

Diese Behandlung bewirkte bei einem Teil der anscheinend toten Kulturen bereits nach einigen Tagen das Auswachsen eines sich rasch entwickelnden Mycels vorwiegend aus dem Teil der Pilzkultur, der in Adhäsion mit der Wand der Kulturröhrchen stand. Die unmittelbar folgende Überimpfung und Identitätsprüfung ergab einwandfreie Reinkulturen der neubelebten Pilze mit zwei Ausnahmen, die durch *Penicillium* verunreinigt waren. Diese Kulturen konnten nicht mehr gerettet werden.

Die Tabelle II zeigt die Ergebnisse der überschichteten Pilzkulturen.

Überblickt man die Tabellen I und II so ergibt sich, daß von den 71 geprüften *Mucorineae* nur 27 nach 24 bzw. 18 Monaten ohne Schwierigkeiten keimten. Als sehr keimfreudig und keimkräftig erwiesen sich alle geprüften *Absidia*-Arten. Von der Gattung *Mucor* fällt bereits nach einer Lebensdauer von 18 Monaten der größte Teil aus und ist nur mehr teilweise durch Überschichten mit Nährlösung zu neuer Vegetation anzuregen.

Tabelle I. Lebensdauer der Mucorineae.

Bedeutung der verwendeten Abkürzungen: + = Kultur angegangen; — = Kultur nicht angegangen; +++, ++, +, sehr gutes, gutes, schwaches Auskeimen der Kulturen.

Nr.	Pilzart	Datum der alten Abimpfung	Nährboden	Datum der neuen Abimpfung	Nährboden	Auskeimen ohne Schwierigkeit	Intensität der Keimung	Erstes frei sichtbares Wachstum	Lebensfähigkeit erhalten nach Monaten
1	*Absidia cylindrospora Hagem*	11. 9. 40	Brot	27. 8. 42	Brot	+	+++	28. 8. 42	24
2	*Abs. dubia Bain.*	„	„	„	„	+	+++	„	24
3	*Abs. glauca Hagem.*	„	„	„	„	+	+++	„	24
4	*Abs. Lichtheimi*	„	„	„	„	+	+++	„	24
5	*Abs. orchidis*	„	„	„	„	+	+++	„	24
6	*Abs. spinosa*	„	„	„	„	+	+++	„	24
7	*Abs. spec.* v. *Föhre*	„	„	„	„	+	+++	„	24
8	*Abs. spec.* v. *Wulfenia*	„	„	„	„	+	+++	„	24
9	*Rhizopus Delemar*	„	„	„	„	+	++	30. 8. 42	24
10	*Rh. japonicus*	„	„	„	„	—	—	—	—
11	*Rh. reflexus*	„	„	„	„	+	+++	28. 8. 42	24
12	*Rh. tonkinensis*	„	„	„	„	—	—	—	—
13	*Rhizopus spec.*	„	„	„	„	+	++	30.8. 42	24
14	*Mucor adventitius*	12. 3. 41	„	„	„	—	—	—	—
15	*M. albo-ater*	„	„	„	„	—	—	—	—
16	*M. attenuatus*	„	„	„	„	—	—	—	—
17	*M. botryoides*	„	„	„	„	+	++	29. 8. 42	18
18	*M. christianiensis*	„	„	„	„	+	++	28. 8. 42	18
19	*M. circinelloides*	„	„	„	„	+	+++	„	18
20	*M. corticolus*	„	„	„	„	—	—	—	—
21	*M. corymbifer*	„	„	„	„	+	++	28. 8. 42	18
22	*M. dispersus*	„	„	„	„	—	—	—	—
23	*M. dubius*	„	„	„	„	—	—	—	—
24	*M. erectus*	„	„	„	„	+	++	28. 8. 42	18

Tabelle I (Fortsetzung).

Nr.	Pilzart	Datum der alten Abimpfung	Nährboden	Datum der neuen Abimpfung	Nährboden	Auskeimen ohne Schwierigkeit	Intensität der Keimung	Erstes frei sichtbares Wachstum	Lebensfähigkeit erhalten nach Monaten
25	*M. flavus*	12. 3. 41	Brot	27. 8. 42	Brot	—	—	—	—
26	*M. fragilis*	,,	,,	,,	,,	—	—	—	—
27	*M. fuscus*	,,	,,	,,	,,	+	+++	28. 8. 42	18
28	*M. genevensis*	,,	,,	,,	,,	—	—	—	—
29	*M. globosus*	,,	,,	,,	,,	+	++	30. 8. 42	18
30	*M. griseo — cyanus*	,,	,,	,,	,,	—	—	—	—
31	*M. heterosporus*	,,	,,	,,	,,	—	—	—	—
32	*M. hiemalis*	,,	,,	,,	,,	—	—	—	—
33	*M. Jansseni*	,,	,,	,,	,,	—	—	—	—
34	*M. javanicus*	,,	,,	,,	,,	—	—	—	—
35	*M. luteus* +	,,	,,	,,	,,	—	—	—	—
36	*M. luteus* —	,,	,,	,,	,,	—	—	—	—
37	*M. luteus*, Zygosporen bildend	,,	,,	,,	,,	—	—	—	—
38	*M. microsporus*	,,	,,	,,	,,	—	—	—	—
39	*M. mucedo* +	,,	,,	,,	,,	—	—	—	—
40	*M. mucedo* —	,,	,,	,,	,,	—	—	—	—
41	*M. mucedo*, Zygosporen bildend	,,	,,	,,	,,	—	—	—	—
42	*M. piriformis*	,,	,,	,,	,,	—	—	—	—
43	*M. plumbeus*	,,	,,	,,	,,	—	—	—	—
44	*M. pusillus*	,,	,,	,,	,,	—	—	—	—
45	*M. racemosus*	,,	,,	,,	,,	+	+++	28. 8. 42	18
46	*M. Ramannianus*	,,	,,	,,	,,	—	—	—	—
47	*M. Rouxianus*	,,	,,	,,	,,	—	—	—	—
48	*M. silvaticus*	,,	,,	,,	,,	+	++	30. 8. 42	18
49	*M. sphaerosporus*	,,	,,	,,	,,	+	++	29. 8. 42	18
50	*M. strictus*	,,	,,	,,	,,	—	—	—	—
51	*M. subtilissimus*	,,	,,	,,	,,	—	—	—	—
52	*M. saturninus*	,,	,,	,,	,,	—	—	—	—
53	*Phycomyces nitens* +	12. 3. 41	,,	,,	,,	—	—	—	—
		8. 3. 42	,,	,,	,,	+	++	29. 8. 42	6

Tabelle I (Fortsetzung).

Nr.	Pilzart	Datum der alten Abimpfung	Nährboden	Datum der neuen Abimpfung	Nährboden	Auskeimen ohne Schwierigkeit	Intensität der Keimung	Erstes frei sichtbares Wachstum	Lebensfähigkeit erhalten nach Monaten
54	*Ph. nitens* —	12. 3. 41	Brot	27. 8. 42	Brot	—	—	—	—
		8. 3. 42	,,	,,	,,	+	++	29. 8. 42	6
55	*Ph. nitens*, Zygosporen bildend	12. 3. 41	,,	,,	,,	—	—	—	—
		8. 3. 42	,,	,,	,,	+	++	29. 8. 42	6
56	*Ph. piloboloides* +	12. 3. 41	,,	,,	,,	—	—	—	—
		8. 3. 42	,,	,,	,,	+	++	29. 8. 42	6
57	*Ph. piloboloides* —	12. 3. 41	,,	,,	,,	—	—	—	—
		8. 3. 42	,,	,,	,,	+	++	29. 8. 42	6
58	*Ph. piloboloides*, Zygosporen bildend	12. 3. 41	,,	,,	,,	—	—	—	—
		8. 3. 42	,,	,,	,,	+	++	29. 8. 42	6
59	*Circinella Sydowi*	11. 9. 40	,,	,,	,,	—	—	—	—
		12. 3. 41	,,	,,	,,	—	—	—	—
60	*Circinella umbellata*	11. 9. 40	,,	,,	,,	+	+++	28. 8. 42	24
61	*Sporodinia grandis*	12. 3. 41	,,	,,	,,	—	—	—	—
		8. 3. 42	Karotte	,,	,,	+	++	28. 8. 42	6
		,,	Brot	,,	,,	—	—	—	—
62	*Pilaira anomala*	12. 3. 41	,,	,,	,,	—	—	—	—
63	*Thamnidium elegans*	,,	Karotten-agar	,,	Karotten-agar	+	+++	30. 8. 42	18
64	*Chaetocladium Jonesii*	11. 9. 40	Brot	,,	Brot	+	++	29. 8. 42	24
65	*Chaetostylum Fresenii*	12. 3. 41	,,	,,	,,	—	—	—	—
66	*Coemansia pectinata*	11. 9. 40 12. 3. 41	Karotten-agar	,,	Karotten-agar	—	—	—	—
67	*Cunninghamella echinulata*	11. 9. 40	Brot	,,	Brot	+	+++	28. 8. 42	24
68	*Syncephalastrum cinereum*	,,	,,	,,	,,	+	+++	,,	24
69	*Zygorhynchus Moelleri*	,,	,,	,,	,,	+	+++	29. 8. 42	24
70	*Mortierella pusilla*	12. 3. 41	,,	,,	,,	+	++	31. 8. 42	18
71	*M. reticulata*	,,	,,	,,	,,	+	++	,,	18

Tabelle II. Lebensdauer der Mucorineae.

Nr.	Pilzart	Datum der alten Abimpfung	Nährboden	Überschichtet mit Nährlösung am	Ausgekeimt und abgeimpft am	Nährboden	Wachstum angegangen	Erstes frei sichtbares Wachstum	Intensität der Keimung	Lebensfähigkeit erhalten nach Monaten
10	*Rhizopus japonicus*	{11. 9. 40 {12. 3. 41	Brot	30. 8.42	—	Brot	—	—	—	—
12	*Rh. tonkinensis*	{11. 9. 40 {12. 3. 41	,,	,,	—	,,	—	—	—	—
14	*Mucor adventitius*	12. 3. 41	,,	,,	4. 9. 42	,,	+	5. 9. 42	++	18
15	*M. albo — ater*	,,	,,	,,	—	,,	—	—	—	—
16	*M. attenuatus*	,,	,,	,,	—	,,	—	—	—	—
20	*M. corticolus*	,,	,,	,,	—	,,	—	—	—	verunreinigt
22	*M. dispersus*	,,	,,	,,	—	,,	—	—	—	,,
23	*M. dubius*	,,	,,	,,	4. 9. 42	,,	+	5. 9. 42	++	18
25	*M. flavus*................	,,	,,	,,	2. 9. 42	,,	+	3. 9. 42	+	18
26	*M. fragilis*...............	,,	,,	,,	3. 9. 42	,,	+	5. 9. 42	++	18
28	*M. genevensis*	,,	,,	,,	—	,,	—	—	—	—
30	*M. griseo-cyanus*	,,	,,	,,	4. 9. 42	,,	+	5. 9. 42	++	18
31	*M. heterosporus*	,,	,,	,,	—	,,	—	—	—	—
32	*M. hiemalis*..............	,,	,,	,,	1. 9. 42	,,	+	2. 9. 42	++	18
33	*M. Jansseni*	,,	,,	,,	—	,,	—	—	—	—
34	*M. javanicus*.............	,,	,,	,,	3. 9. 42	,,	+	4. 9. 42	++	18
35	*M. luteus* + ...	,,	,,	,,	—	,,	—	—	—	—
36	*M. luteus* —	,,	,,	,,	—	,,	—	—	—	—
37	*M. luteus*, Zygosporen bildend	,,	,,	,,	4. 9. 42	,,	+	6. 9. 42	+	18
38	*M. microsporus*	,,	,,	,,	—	,,	—	—	—	—

Tabelle II (Fortsetzung)

Nr.	Pilzart	Datum der alten Abimpfung	Nährboden	Überschichtet mit Nährlösung am	Ausgekeimt und abgeimpft am	Nährboden	Wachstum angegangen	Erstes frei sichtbares Wachstum	Intensität der Keimung	Lebensfähigkeit erhalten nach Monaten
39	*M. mucedo* +	12. 3. 41	Brot	30. 8. 42	—	Brot	—	—	—	—
40	*M. mucedo* —	,,	,,	,,	—	,,	—	—	—	—
41	*M. mucedo*, Zygosporenbildend	,,	,,	,,	—	,,	—	—	—	—
42	*M. piriformis*	,,	,,	,,	—	,,	—	—	—	—
43	*M. plumbeus*	,,	,,	,,	4. 9. 42	,,	+	5. 9. 42	++	18
44	*M. pusillus*	,,	,,	,,	2. 9. 42	,,	+	4. 9. 42	+	18
46	*M. Ramannianus*	,,	,,	,,	4. 9. 42	,,	+	6. 9. 42	++	18
47	*M. Rouxianus*	,,	,,	,,	3. 9. 42	,,	+	4. 9. 42	++	18
50	*M. strictus*	,,	,,	,,	—	,,	—	—	—	—
51	*M. subtilissimus*	,,	,,	,,	—	,,	—	—	—	—
52	*M. saturninus*	,,	,,	,,	—	,,	—	—	—	—
53	*Phycomyces nitens* +	,,	,,	,,	—	,,	—	—	—	—
54	*Ph. nitens* —	,,	,,	,,	—	,,	—	—	—	—
55	*Ph. nitens*, Zygosporenbildend	,,	,,	,,	—	,,	—	—	—	—
56	*Ph. piloboloides*	,,	,,	,,	—	,,	—	—	—	—
57	*Ph. piloboloides* —	,,	,,	,,	—	,,	—	—	—	—
58	*Ph. piloboloides*, Zygosporen bildend	,,	,,	,,	6. 9. 42	,,	+	8. 8. 42	+	18
59	*Circinella Sydowii*	11. 9. 40 12. 3. 41	,,	,,	—	,,	—	—	—	—
61	*Sporodinia grandis*	12. 3. 41	,,	,,	—	,,	—	—	—	—
		8. 3. 42	,,	,,	3. 9. 42	,,	+	4. 9. 42	++	6
62	*Pilaira anomala*	12. 3. 41	,,	,,	—	,,	—	—	—	—
65	*Chaetostylum Fresenii*	,,	,,	,,	—	,,	—	—	—	—
66	*Coemansia pectinata*	11. 9. 40 12. 3. 41	Karottenagar	,,	—	,,	—	—	—	—

Besonders empfindlich sind alle *Phycomyces*-Arten, von denen nur eine Kultur von *Phycomyces piloboloides Burgeff*, die Zyposporen bildete, nach 18. Monaten durch Überschichten mit Nährlösung zu neuer Vegetation angeregt werden konnte. Ein ähnliches Verhalten zeigt *Mucor luteus Linnemann*. Während der Pilz aufgespalten in +- und —-Stämme schon nach 5 Monaten sehr schwer auskeimt, gelingt es, eine Kultur, die beide Stämme Zygosporen bildend enthält, noch nach 18 Monaten, allerdings auch erst nach gründlicher Durchtränkung mit Nährlösung zur Keimung zu veranlassen. Bei *Mucor mucedo* Zygosporen bildend konnte auch diese Kultur nicht mehr zum Wachstum angeregt werden. Dieser Pilz stirbt aufgespalten in seine +- und —-Stämme schon nach 6 bis 8 Monaten ab, kaum ein Jahr ist die Zygosporen bildende Kultur keimfähig.

Sehr empfindlich gegen Austrocknung ist auch *Sporodinia grandis*. 6 Monate alte Brotkulturen keimen nur mehr nach Durchtränkung und da selten, während ebenso alte Karottenagar-Kulturen noch auskeimten, wenn das Impfmycel von noch feuchten Stellen der Agar-Oberfläche entnommen wird. Sehr empfindlich ist *Coemansia pectinata*. Diese Art wächst sehr langsam, auf den üblichen Nährböden oft gar nicht. Sie gedeiht aber gut auf $1\frac{1}{2}\%$igem Karottenagar sowie auf Haferflocken. Die Keimfähigkeit erlischt meist nach 6 Monaten, gelegentlich gelingt es, den Pilz nach 8 Monaten noch zu neuer Vegetation anzuregen.

Bemerkenswert ist die Keimkraft von *Circinella umbellata*, die, wie mehrfach festgestellt werden konnte, noch nach $3^1/_2$ Jahren keimt, während ein —-Stamm der *Circinella Sydowii* nach 18 Monaten nicht mehr zur Keimung zu bringen war.

Untersucht man diejenigen *Mucor*-Arten, die ohne Schwierigkeiten nach 18 Monaten keimen oder nach Durchtränkung mit Nährlösung zu neuem Wachstum angeregt werden, so ergibt sich, daß die meisten von ihnen Gemmen bilden. Es sind offenbar diese Dauerzustände, welche die vollständige Austrocknung ertragen und überstehen können. Solche Gemmen finden sich unter anderen bei *Mucor hiemalis*, *M. racemosus*, *M. erectus*, *M. Rouxianus*, *M. javanicus*, *M. circinelloides*, *M. plumbeus*.

Es mag erwähnt sein, daß *Mucor globosus Fischer* und *Mucor sphaerosporus Hagem*, die in letzter Zeit als synonym angeführt werden, gleich keimkräftig sind; ebenso gilt dies für *Mucor racemosus Fresenius* und dem angeblich synonymen *Mucor christianiensis Hagem*, weiter für *Mucor erectus Bainier*. als synonym mit *Mucor hiemalis Wehmer* angegeben.

Die gute Keimfähigkeit von *Mucor corymbifer Cohn* braucht daher nicht zu überraschen, da dieser Pilz synonym mit *Absidia Lichtheimi*

(*Lucet* u. *Cost.*) *Lendner* gilt und alle *Absidia*-Arten, wie oben erwähnt, sehr keimkräftig sind und lang anhaltende Austrocknung vertragen.

Bemerkenswert ist auch die gute Keimfähigkeit des *Mucor pusillus Lindt*, was nicht ohne Wichtigkeit ist, da dieser Pilz mehrmals als pathogen wirkend beschrieben wird. Überraschend groß ist auch die Keimkraft der „Konidien" bildenden Familien der *Mucorineae*, sowie der Arten der Gattung *Thamnidium*, soweit sie untersucht wurden.

Die Tabelle III zeigt vor allem, daß sich die beobachteten Arten der *Ascomycetes*, *Basidiomycetes* und der *Fungi imperfecti* dadurch auszeichnen, daß ihre Keimfähigkeit trotz völliger Austrocknung meist noch nach zwei und mehr Jahren erhalten ist. Einzelne Arten der Gattung *Aspergillus* sind etwas empfindlicher, alle aber keimten ohne Schwierigkeiten noch nach 18 Monaten, die meisten auch noch nach 29 Monaten. Von *Aspergillus niger* standen drei Stämme zur Verfügung. *Stamm Zach* keimte noch nach 29 Monaten, allerdings sehr langsam, *Stamm Zobl* keimte nach 18 Monaten ohne Schwierigkeit, nach 29 Monaten trotz Befeuchten mit Bierwürze nicht mehr. Ebenso verhielt sich ein Säure bildender Stamm. Daraus ergibt sich, daß die einzelnen Stämme verschieden widerstandsfähig gegen das Austrocknen sind.

Von Bedeutung ist die Tatsache, daß Arten der Gattungen *Acaulium*, *Scopulariopsis* und *Microascus*, die vor kurzem als entwickelungsgeschichtlich zusammengehörig erkannt wurden und die häufig bei Erkrankungen der Haut, vor allem der Nägel isoliert wurden, noch nach 29 bzw. 35 Monaten ihre volle Keimkraft bewahrt hatten. Die Art *Scopulariopsis oidiospora* ist etwas empfindlicher und keimt nur schwierig und sehr langsam aus.

Auch Arten der Gattungen *Microsporon*, *Trichophyton*, *Candida*, von denen eine große Zahl als Erreger von Haut- und Haarkrankheiten bei Mensch und Tier erkannt wurden, sind sehr widerstandsfähig gegen Austrocknung.

Die als Erreger der Blaufäule des Holzes bekannten Arten der Gattung *Ceratostomella* (*Endoconidiophora*, *Ophiostoma*) keimten noch nach 18, 27 und 29 Monaten aus, es war keine Verminderung der Keimkraft feststellbar.

Von besonderer Keimfähigkeit erweisen sich Arten der Gattung *Melanospora Corda*. Alle sechs geprüften Arten keimten noch nach 41 Monaten aus. *Zobl* (20) beobachtete, daß Sporen von *Melanospora leucotricha* noch nach 6 Jahren 8 Monaten bzw. 7 Jahren 6 Monaten ohne Schwierigkeit auskeimten und nach 16 Tagen bereits Perithecien gebildet wurden. Sporen aus einer Kultur vom 20. März 1929 und einer Kultur vom 4. Juni 1928 erwiesen sich nach dem Abimpfen am 10. Dezember 1935 noch keimfähig. Sie keimten am 14. Dezember 1935 aus und hatten am 26. Dezember 1935 die ersten Perithecien gebildet.

Tabelle III. Lebensdauer von Ascomycetes, Basidiomycetes und Fungi imperfecti.
Abkürzungen wie in Tabelle I.

Nr.	Pilzart	Datum der alten Abimpfung	Nährboden	Datum der neuen Abimpfung	Nährboden	Auskeimen ohne Schwierigkeit	Intensität der Keimung	Erstes frei sichtbares Wachstum	Lebensfähigkeit erhalten nach Monaten	Beginn der Fruchtkörperbildung
72	*Aspergillus albus*	9. 4. 40 12. 3. 41	Karotten-agar	2. 9. 42	Karotten-agar	+	+++	3. 9. 42	29	
73	*A. candidus*	12. 3. 41	„	„	„	+	+++	„	18	
74	*A. clavatus*	9. 4. 40 12. 3. 41	„	„	„	+	+++	„	29	
75	*A. elegans*	12. 3. 41	„	„	„	+	+++	4. 9. 42	18	
76	*A. Fischeri*	„	„	„	„	+	+++	3. 9. 42	18	
77	*A. flavus*	9. 4. 40 12. 3. 41	„	„	„	+	+++	„	29	
78	*A. fumigatus*	9. 4. 40 12. 3. 41	„	„	„	+	+++	„	29	
79	*A. glaucus*	12. 3. 41	„	„	„	+	+	5. 9. 42	18	
80	*A. malignus*	„	„	„	„	+	+++	3. 9. 42	18	
81	*A. nidulans*	„	„	„	„	+	++	„	18	
82	*A. niger*, Stamm *Zach*	9. 4. 40 12. 3. 41	„	„	„	+	+++.	„	29	
83	*A. niger*, Stamm *Zobl*	9. 4. 40 12. 3. 41	„	„	„	+	+++	„	18	
84	*A. niger*, Säure bildend	9. 4. 40 12. 3. 41	„	„	„	+	+++	„	18	
85	*A. ochraceus*	9. 4. 40 12. 3. 41	„	„	„	—	—	—	—	verunreinigt
86	*A. oryzae*	12. 3. 41	„	„	„	+	++	3. 9. 42	18	
87	*A. terricola*	9. 4. 40 12. 3. 41	„	„	„	+	+++	„	29	
88	*A. Wentii*	9. 4. 40 12. 3. 41	„	„	„	+	+++	„	29	

Tabelle III (Fortsetzung).

Nr.	Pilzart	Datum der alten Abimpfung	Nährboden	Datum der neuen Abimpfung	Nährboden	Auskeimen ohne Schwierigkeit	Intensität der Keimung	Erstes frei sichtbares Wachstum	Lebensfähigkeit erhalten nach Monaten	Beginn der Fruchtkörperchenbildung
89	*Aspergillus* v. *Zichorie*	9. 4. 40 12. 3. 41	Karottenagar	2. 9. 42	Karottenagar	+	++	3. 9. 42	29	
90	*Asp.* v. *Apfel*	9. 4. 40 12. 3. 41	,,	,,	,,	+	+++	,,	29	
91	*Acaulium insectivorum*	9. 5. 40	Kartoffel	29. 8. 42	Kartoffel	+	++	30. 8. 42	28	
92	*Ac. nigrum*	,,	,,	,,	,,	+	++	,,	28	
93	*Ac. violaceum*	,,	,,	,,	,,	+	++	,,	28	
94	*Scopulariopsis albo-flavescens*	10. 4. 40	,,	,,	,,	+	++	,,	29	
95	*Scop. brevicaulis*	,,	,,	,,	,,	+	+++	,,	29	
96	*Scop. fusca*	,,	,,	,,	,,	+	+++	,,	29	
97	*Scop. oidiospora*	,,	,,	,,	,,	+	+	,,	29	
98	*Scop. sphaerospora*	,,	,,	,,	,,	+	+++	,,	29	
99	*Microascus cirrosus*	18. 10. 39	,,	,,	,,	+	+++	,,	35	8. 9. 42
100	*Microascus intermedius*	,,	,,	,,	,,	+	++	31. 8. 42	35	17. 9. 42
101	*Microascus trigonosporus* . .	,,	,,	,,	,,	+	++	30. 8. 42	35	6. 9. 42
102	*Gymnoascus Reesii*	7. 3. 40	,,	28. 8. 42	,,	+	+++	31. 8. 42	30	4. 10. 42
103	*Ceratostomella coerulea*	12. 4. 40	Karottenagar	,,	Karottenagar	+	++	29. 8. 42	29	10. 9. 42
104	*Cer. cana*	15. 6. 40	,,	,,	,,	+	++	1. 9. 42	27	—
105	*Cer. piceae*	12. 4. 40	,,	,,	,,	+	+++	29. 8. 42	29	6. 9. 42
106	*Cer. quercus*	12. 3. 41	,,	,,	,,	+	++	,,	18	20. 9. 42
107	*Cer. stenoceras*	15. 6. 40	,,	,,	,,	+	++	1. 9. 42	27	8. 9. 42
108	*Cer. Annabichl*	12. 4. 40	,,	,,	,,	+	+++	29. 8. 42	29	3. 9. 42
109	*Cer. Zöptau*	,,	,,	,,	,,	+	+++	,,	29	,,
110	*Cer. fimbriata*	,,	,,	,,	,,	+	+++	,,	29	7. 9. 42
111	*Cer. adiposa*	12. 3. 41	,,	,,	,,	+	+++	,,	18	12. 9. 42
112	*Cer. moniliformis*	12. 4. 40	,,	,,	,,	—	—	—	—	—
113	*Melanospora anomala*	20. 3. 39	,,	29. 8. 42	,,	+	++	1. 9. 42	41	steril
114	*Mel. destruens*	,,	,,	,,	,,	+	+++	30. 8. 42	41	3. 9. 42

Tabelle III (Fortsetzung).

Nr.	Pilzart	Datum der alten Abimpfung	Nährboden	Datum der neuen Abimpfung	Nährboden	Auskeimen ohne Schwierigkeit	Intensität der Keimung	Erstes frei sichtbares Wachstum	Lebensfähigkeit erhalten nach Monaten	Beginn der Fruchtkörperchenbildung
115	*Mel. leucotricha*	20. 3. 39	Karottenagar	29. 8. 42	Karottenagar	+	+++	30. 8. 42	41	5. 9. 42
116	*Mel. pampeana*............	,,	,,	,,	,,	+	+++	31. 8. 42	41	4. 9. 42
117	*Mel. parasitica*	,,	,,	,,	,,	+	+++	30. 8. 42	41	6. 9. 42
118	*Mel. zamiae*	,,	Malzagar	,,	,,	+	+++	31. 8. 42	41	2. 9. 42
119	*Pyrenomycet* (*Petriella?*) ..	,,	Kartoffel	,,	,,	+	+++	,,	41	8. 9. 42
120	*Endomyces Magnusii*	12. 3. 41	Malzagar	,,	,,	+	+++	30. 8. 42	18	
121	*Endomycopsis fibuliger*.....	,,	,,	,,	,,	+	+++	,,	18	
122	*Endomycopsis vernalis*	,,	,,	,,	,,	+	+	,,	18	
123	Sporogene *Hefe*...........	,,	,,	,,	,,	+	+++	,,	18	
124	*Schizosaccharomyces octospor.*	,,	,,	,,	,,	+	++	,,	18	
125	*Schizosaccharomyces mellacei*	,,	,,	,,	,,	+	++	,,	18	
126	*Schizos. Pombé*...........	,,	,,	,,	,,	+	++	,,	18	
127	*Oidium lactis*	,,	,,	,,	,,	+	+++	,,	18	
128	*Acrotheca pedrosoi*	,,	,,	28. 8. 42	,,	+	++	,,	18	
129	*Isaria farinosa*............	,,	,,	,,	,,	+	++	,,	18	
130	*Beauveria Bassiana*	,,	,,	,,	,,	+	++	,,	18	
131	*Penicillium claviforme*......	15. 6. 40	,,	,,	,,	+	+++	29. 8. 42	27	Coremien 1. 9. 42
132	*Penic. spec.* v. *Hefe*	,,	,,	,,	,,	+	+++	,,	27	
133	*Penic. spec.* v. *Kastanie*	,,	,,	,,	,,	+	++	31. 8. 42	27	
134	*Penic. brevicaule*	10. 4. 40	,,	,,	,,	+	+++	29. 8. 42	29	
135	*Microsporum audouini Gruby*	12. 3. 41	,,	29. 8. 42	Malzagar	+	++	4. 9. 42	18	
136	*Sporotrichum Beurmanni* ..	,,	,,	2. 9. 42	,,	+	++	3. 9. 42	18	
137	*Cladosporium herbarum*	,,	,,	,,	,,	+	+	4. 9. 42	18	
138	*Cephalosporium spec.*	,,	,,	,,	,,	+	+	6. 9. 42	18	
139	*Cordiceps spec.*............	20. 3. 41	,,	,,	,,	+	+++	3. 9. 42	18	
140	*Nephrospora Mangini*	12. 3. 41	,,	,,	,,	+	+++	4. 9. 42	18	
141	*Trichophyton gypseum*, Stamm *Zobl*............	,,	,,	,,	,,	+	++	3. 9. 42	18	

Tabelle III (Fortsetzung).

Nr.	Pilzart	Datum der alten Abimpfung	Nährboden	Datum der neuen Abimpfung	Nährboden	Auskeimen ohne Schwierigkeit	Intensität der Keimung	Erstes frei sichtbares Wachstum	Lebensfähigkeit erhalten nach Monaten	Beginn der Fruchtkörperchenbildung
142	*Blastodendrion palati*	11. 3. 42	Malzagar	2. 9. 42	Malzagar	+	+++	3. 9. 42	6	
143	*Blastodendrion gracile*	12. 3. 41	,,	,,	,,	+	+++	,,	18	
144	*Torula histolytica*	,,	,,	,,	,,	+	+++	,,	18	
145	*Debaryomyces subglobosa*	,,	,,	,,	,,	+	+++	,,	18	
146	*Torulopsis aurantia*	,,	,,	,,	,,	+	+++	,,	18	
147	*Cryptococcus rubrorugosus*	,,	,,	,,	,,	+	+++	,,	18	
148	*Stemphylium cladosporium*	,,	,,	,,	,,	+	+	6. 9. 42	18	
149	*Trichophyton radiolatum*	,,	,,	,,	,,	+	++	3. 9. 42	18	
150	*Clitocybe olearia*	4. 6. 40	Ahornholz	27. 8. 42	Kartoffel	+	+	1. 9. 42	27	leuchtet s. 25. 9. 42
151	*Coniophora cerebella*	,,	,,	,,	,,	+	++	3. 9. 42	27	
152	*Lentinus squamosus*	,,	,,	,,	,,	+	+	20. 9. 42	27	
153	*Schizophyllum commune*	20. 3. 39	,,	,,	,,	+	+++	29. 8. 42	41	3. 9. 42

Auch die geprüften *Basidiomyceten* (*Clitocybe olearia*, *Coniophora cerebella*, *Lentinus squamosus*, *Schizophyllum commune*) erwiesen sich sehr widerstandsfähig. Alle keimten noch nach 27 Monaten. *Schizophyllum commune* hatte noch nach 41 Monaten die Keimfähigkeit nicht eingebüßt.

Zusammenfassung.

Es wurden 153 Pilzarten auf ihre Keimfähigkeit hin geprüft.

Die *Mucorineae* sind im Vergleich zu den meisten *Ascomycetes*, *Basidiomycetes* und *Fungi imperfecti* gegen Austrocknen sehr empfindlich und sterben in der Mehrzahl zwischen 6 bis 18 Monaten ab.

Bemerkenswert ist das Vermögen der meisten als pathogen angesehenen Pilze. langdauernde Trockenheit zu ertragen, ohne irgendwie die Keimkraft einzubüßen.

Von allen untersuchten Pilzen waren die Perithecien bildenden Arten der Gattungen *Ceratostomella* und *Melanospora* am widerstandsfähigsten, sie keimten noch nach $3^1/_2$, 6 und $7^1/_2$ Jahren.

Literatur.

1) *C. Wehmer*, Ber. d. Deutsch. bot. Ges. **22**, 476, 1904. — 1a) *Derselbe*, Centralbl. f. Bakt. II, **3**, 149, 1897. — 1b) *Derselbe*, Die Pilzgattung

Aspergillus, S. 43, Genf 1901. — 1c) *Derselbe*, Ann. Mycologici 1, 38, 1903. — 2) *E. Eidam*, Beitr. z. Biol. d. Pflanzen 8, 397, 1883. — 3) *A. de Bary*, Vergleichende Morphologie und Biologie der Pilze, S. 369. Leipzig 1884. — 4) *Ph. van Tieghem* u. *G. Lemonnier*, Recherches sur les Mucorinées, S. 30, 32. Paris, Masson, 1873. — 5) *E. Chr. Hansen*, Bot. Ztg. 1897, LV. Jahrg., 1. Abt., S. 121, 125, 127. — 5a) *Derselbe*, Bot. Zentralbl. 1885, Nr. 6. — 6) *O. Brefeld*, Schimmelpilze, II, S. 76; III, S. 15; IV, S. 66. — 7) *Hoffmann*, Jahrb. wiss. Bot. 2, 267, 302, 334, 1860. — 8) *O. E. R. Zimmermann*, Diss. Jena, S. 40, Chemnitz 1871. — 9) *v. Liebenberg*, Oesterr. Landw. Wochenbl. 1879, Nr. 43 u. 44. — 10) *Acosta*, Centralbl. f. Bakt. 17, 465, 1895. — 11) *N. M. Berestneff*, ebenda I, 40, 298, 1907. — 12) *F. Siebenmann*, Die Schimmelmycosen des menschlichen Ohres, 2. Aufl., S. 26. Wiesbaden 1889. — 13) *O. Busse*, Die Hefen als Krankheitserreger, S. 15. Berlin 1897. — 14) *R. Meissner*, Zeitschr. f. Weinbau u. Weinbehandlung 2, 103, 1915. — 14a) *Derselbe*, Zeitschr. f. Gärungsphysiol. 1, 106, 1912. — 15) *A. Klöcker*, C. r. des Trav. du Labor. de Carlsberg 11, 297—311, 1917. — 16) *H. Wille*, Centralbl. f. Bakt. II, 48, 35—41, 1917. — 16a) *Derselbe*, ebenda II, 44, 58—75, 1915. — 16b) *Derselbe*, ebenda II, 31, 346—453, 1911. — 17) *A. R. Ling* u. *D. R. Nanij*, Proc. Roy. Soc. Edinburgh 92, 355, 1921. — 17a) *Dieselben*, Wochenschr. f. Brauerei 89, 54, 1922. — 18) *H. C. Plaut*, Neue Beiträge zur systematischen Stellung des Soorpilzes in der Botanik, S. 23. Leipzig 1887. — 19) *A. Lendner*, Les Mucorinées de la Suisse, Bern 1908. — 20) *K. H. Zobl*, Untersuchungen über den Bau und die Entwicklung des Pyrenomyceten Melanospora leucotricha Corda. Wien 1940.

Beobachtungen über Mucor Jansseni Lendner.

Von

K. H. Zobl, Wien.

Mit 2 Abbildungen im Text.

(Eingegangen am 10. Januar 1943.)

Bei Untersuchungen über Standorte und Verbreitung einheimischer *Mucoraceae* wurde aus mehreren Erdproben, die aus räumlich weiter entfernten Gegenden stammten, neben zahlreichen anderen Arten *Mucor Jansseni* isoliert.

Die Isolierung wurde in allen Fällen auf 2% Bierwürzeagar vorgenommen, auf dem kleine Erdkrümelchen ausgesät wurden. Die Proben stammten von folgenden Örtlichkeiten: Gemischter Nadelwald, vorherrschend Fichte, in der Gegend des Plöckenpaß (20. Juni 1937), Villacheralpe (2. September 1938), Ullrichsberg (15. August 1937), Loiblpaß (20. September 1938), Tristachersee (Umgebung von Lienz, 25. September 1938), alle Kärnten, die Höhenlage betrug zwischen 800 und 1300 m; Mischwald aus vorwiegend Fichte, Buche und Hasel aus der Umgebung von Zöptau, Berggeist, Altvater (September 1939), alle Sudetengau, Höhenlage zwischen 300 und 1400 m. Die Kärntner Erdproben stammen aus einer ungedüngten Verwitterungskrume, die auf kalkigem Untergrund aufliegt, während die Erde aus dem Sudetengau ebenfalls ungedüngt auf gneisig-schiefriger Urgesteinsunterlage ruht. Der Pilz ist recht selten. Er konnte in 870 Erdproben aus verschiedenen Gebieten nur in 11 Fällen der oben angeführten Örtlichkeiten nachgewiesen werden.

Ein Vergleich dieser aus verschiedenen Gegenden, Höhen und Bodenunterlagen herrührenden Stämme ließ morphologisch und physiologisch keine Unterschiede erkennen, so daß diese Art sehr konstant ist.

Der Pilz wurde das erste Mal von *A. Lendner* aufgefunden und beschrieben, der ihn aus einer Erdprobe aus dem Mont Blanc-Gebiet (4810 m) im Sommer 1906 gezüchtet hat (1). *Ling-Young* (1930) isolierte ihn aus Erdproben, die aus der Auvergne, Frankreich, stammten (2). *G. Linnemann* züchtete diesen Pilz aus einer Erdprobe, die aus einem sehr vegetationsarmen Basalthang (Amöneburg, Umgebung Marburg, Juli 1934) stammte (3).

Die Beschreibung und Abbildungen, die *Lendner* gibt, lassen eine ergänzende Untersuchung wünschenswert erscheinen, zumal auch *Ling-Young* und *Linnemann* sich nur auf die Angaben von *Lendner* berufen und keine eingehendere Untersuchung durchgeführt haben, da sie in der Hauptsache floristisch arbeiteten. Wir möchten daher im nachfolgenden eine Ergänzung hierzu geben und auch einiges über die Physiologie dieses Pilzes mitteilen. Die Untersuchungen wurden auf alle Stämme ausgedehnt und ergaben im wesentlichen übereinstimmende Ergebnisse.

I. Makroskopisches Aussehen der Kulturen.

Wir haben uns bei der Beschreibung der Kulturen an die von *Zycha* (4) formulierten Grundsätze über Nährböden und Nährbödeneinfluß gehalten, denn nur so ist, wie *Zycha* ganz richtig angibt, eine einigermaßen sichere Diagnose möglich. Wir beobachteten das Wachstum des Pilzes auf verschiedenen Substraten, stets aber nach mehrmaliger, meist fünf- bis achtmaliger Passage. Dadurch gewöhnt sich der Pilz an den Nährboden. Während er anfangs Wachstumsvarietäten bildet, Involutionsformen, zeigt er nach Gewöhnung sein wahres arteigenes Wachstum. Wir haben die Beobachtung gemacht, daß *Mucoraceae*, direkt von ihrem natürlichen Standort entnommen und mikroskopisch untersucht, oft zu Fehldiagnosen verleiten und damit Anlaß geben zur Beschreibung angeblich neuer Arten oder Varietäten. Denn abgesehen von einigen schnell und kräftig wachsenden Arten sind viele *Mucoraceae* (dies gilt aber auch für viele andere Pilze) gezwungen, in der ganzen, auf natürlichen Substraten auftretenden Mikroflora und Mikrofauna eine mehr minder beengte, oft recht kümmerliche Vegetation zu führen. Sie erreichen dadurch selten ihre volle Entfaltung, die in der Regel erst in der Reinkultur und da erst nach mehreren Passagen auftritt. Dem großen Nachteil des Ausbleibens der Zygotenbildung bei heterothallischen Arten in den Einsporenkulturen kann man gelegentlich so beikommen, daß möglichst viele Stämme der gleichen Art vom selben Fundort isoliert werden. Durch Kombination der Stämme erhält man dann manchmal doch die Zygotenbildung.

Mucor Jansseni zeigt auf Brot, Bierwürze-, Karottenpepton-, Gorodkowa- und Malzagar ziemlich gleichartiges Wachstum. Auf Kartoffel und Karotte bleibt er im Wachstum anfangs etwas zurück. Auch bleibt die Farbe des Rasens durch stärkere Untermischung mit Luftmycel länger weißlich und ist auch später oft nicht sehr ausgeprägt. Bei Karotten spielt die Herkunft bzw. die Düngung eine wichtige Rolle. Wir haben häufig bemerkt, daß Karotten aus reichlich, besonders mit Kunstdünger gedüngten Böden schlechte Nährböden abgeben, während solche, die aus mit Stallmist, und nicht zu reichlich gedüngten Böden stammen, dem Pilz besser zusagten, was vor allem in der für *Mucor Jansseni* charakteristischen Färbung des Rasens zum Ausdruck kommt. Die Konzentration der Nährstoffe im Substrat spielt überhaupt eine wesentliche Rolle. Es gibt eine maximale und optimale Konzentration, aber auch ein Nährstoffminimum. Während das letztere meist gut bekannt ist, wird das Optimum und Maximum nicht gebührend berücksichtigt. Deutlich ist dies bei Bierwürze festzustellen. Wir finden in der Literatur meist nur die Bemerkung, daß Bierwürzeagar oder flüssige Bierwürze irgendwelcher Herkunft verwendet wurde, nähere

Angaben fehlen. Selbst hergestellte Würze [nach *Windisch* aus *Janke-Zickes*, S. 50 (5)] enthält, wie wir mehrfach feststellen konnten, sehr viel mehr Nährstoffe als die von Brauereien bezogene, deren Nährstoffgehalt außerordentlich wechselt. Sie stellt eine Nährlösung von maximaler Konzentration (12 bis 15° Balling) dar.

Mucor Jansseni wächst darauf anfangs unter Bildung eines stark ölhaltigen Substratmycels, bildet reichlich Chlamydosporen (in diesem Fall ein Zeichen ungünstiger Lebensbedingungen durch überreichliche Ernährung), weißliches Luftmycel und erst nach Reduktion der Nährstoffe des Substrats entsteht stark verspätet ein Rasen von Sporangienträgern. Würze von 5° Balling läßt viel rascher das charakteristische Wachstum von *M. Jansseni* zu. Sie bietet dem Pilz eine optimale Konzentration an Nährstoffen. Auch der p_H-Wert beeinflußt das Wachstum und muß entsprechend berücksichtigt werden. Über das Zusammenwirken von Konzentration der Nährstoffe, p_H-Wert und Temperatur sind Untersuchungen im Gange. Mancher Widerspruch über das Wachstum, z. B. auf Bierwürze, der sich in der Literatur findet, so auch für *Mucor Jansseni* zwischen *Lendner* und *Linnemann*, ließ sich unter Berücksichtigung der oben angeführten Gründe ohne Schwierigkeit aufklären.

Mucor Jansseni bildet auf Würze- und Malzagar (Würze von 5° Balling, 3 % Malzextrakt, Biomalz; 2 % Agar-Agar), sowie Brot nach 4 bis 6 Tagen einen blaugrauen, 0,6 bis 1 cm hohen Rasen, der nach 8 bis 12 Tagen seine volle Ausbildung erreicht. Einzelpartien des Rasens werden 1,5 selten 2 cm hoch. Das Substratmycel ist nicht übermäßig entwickelt. Die Sporangienträger sind anfangs unverzweigt, mit fortschreitender Höhe tritt starke Verzweigung ein (Abb. 1, Fig. 1). Die Verzweigung ist vorherrschend sympodial. Doch geht dieses reichlich sympodial verzweigte Astsystem gegen die Spitze zu meist in eine mehr minder deutliche racemöse Verzweigung über. Ältere Rasen zeigen beide Verzweigungsarten in einem solchen Verhältnis, daß die Zuordnung sowohl zur Sectio *Racemomucor*, als auch zur Sectio *Cymomucor* erfolgen kann. Wenn auch der Verzweigungsmodus kein konstantes Merkmal ist, so kann immerhin daraus ein erster Anhalt zur Bestimmung der Art gewonnen werden. Die Sporangien sind innerhalb des ganzen Rasens verteilt, irgendeine vorherrschende Schicht ist nicht zu erkennen. Die Sporangien sind mit freiem Auge als dunkle, fast schwärzliche Pünktchen im Rasen erkennbar. Das Mycel ist anfangs weiß, mit zunehmender Ausbildung des Rasens tritt eine Verfärbung ein, die von hellgrau über blaugrau zu einer blauschwarzen Tönung des Mycels führt, die durch die dunkle, fast schwarze Färbung der Sporangien verstärkt wird. Immer besitzt der Rasen auf Brot, Würze- und Malzagar diesen eigenartigen blauen Farbton, der die Unterscheidung von anderen

Arten wesentlich erleichtert. Besonders schön tritt manchmal die Farbe des Rasens auf Karotten hervor, wenn man gerade die dem Pilz zusagende Sorte verarbeiten konnte. Meist aber bildet er hier eine mehr schmutzigbraune Farbe aus. Auf Karottenpepton- und Gorodkowaagar bleibt der Rasen niedriger, meist 0,5 bis 0,8 cm hoch. Das Substratmycel verfärbt sich gelblich bis orange, der darüber befindliche Rasen wird hellgrau bis bräunlich. Auf allen verwendeten festen Nährböden entstanden im Gegensatz zu *Lendner* Sporangien. Die Höhe des Rasens gibt *Lendner* mit 2 bis 6 mm zu niedrig an, was auch schon *Linnemann* aufgefallen ist. In flüssigen Nährböden (Bierwürze 5° Balling, 2% Peptonlösung mit 3% Traubenzucker) entwickelt der Pilz nur ein farbloses, in größeren Mengen weißlich scheinendes Mycel. Solange das Mycel die Oberfläche der Nährflüssigkeit nicht erreicht, werden keine Sporangien ausgebildet. Erst wenn sich in der Oberfläche der Flüssigkeit eine genügend dicke Schichte von Substratmycel entwickelt hat, beginnen Sporangienträger herauszuwachsen. Dann tritt auch bald die blaugraue Verfärbung des Rasens ein.

II. Mikroskopische Beobachtungen.

Die Sporen (Abb. 1, Fig. 2) sind kugelig, selten geringfügig oval, hyalin, farblos oder mit einem schwach bläulichen Stich. Im ganzen ist ihre Form und Größe sehr beständig, unabhängig von den Substraten. Der Durchmesser beträgt 4 bis 6 μ. In Würze oder einer anderen Nährflüssigkeit schwellen sie rasch an, und man erkennt dann im Innern der Spore Fettröpfchen (nachgewiesen mit Sudan III und Osmiumsäure). und kleinere, mitunter auch größere Vakuolen. Bald erreichen sie 10 bis 17 μ im Durchmesser, verlieren ihre Kugelgestalt und keimen mit einem oder zwei Keimschläuchen aus. Nach 20 bis 24 Stunden sind schon reichlich verzweigte Hyphen im Substrat gebildet, die bald danach mit freiem Auge sichtbar werden. Nach 48 bis 72 Stunden sind vereinzelt die ersten Sporangien gebildet. Die Hyphen sind anfangs nur wenig septiert, gleichmäßig breit. Die Breite ist wechselnd und nimmt gegen die Wachstumsspitzen zu ab. Später tritt reichlich Querwandbildung auf, besonders an den Verzweigungsstellen. Der Inhalt junger Hyphen ist hyalin, von leicht bläulicher Tönung. Ältere Hyphen enthalten reichlich Fettröpfchen und zahlreiche Vakuolen. Junge Hyphen sind glatt, ältere sehen streifig aus. Dies kommt dadurch zustande, daß feinste Inkrustationen an der Oberfläche der Hyphen entstehen, die oft regelmäßig in Linien verlaufend abgeschieden werden. An den Verzweigungsstellen und etwas unterhalb der Sporangien sind die Hyphen manchmal geringfügig aufgetrieben. Es werden Chlamydosporen gebildet (Abb. 1, Fig. 3 u. 3a), die von mannigfaltiger Gestalt sind, doch auf festen Nährböden nicht allzu reichlich entstehen. Sie

sind kugelig, oval, tonnenförmig oder auch ganz unregelmäßig geformt, haben eine derbere Membran und enthalten reichlich Reservestoffe, hauptsächlich fettes Öl. Diese Gemmen können an allen Stellen des

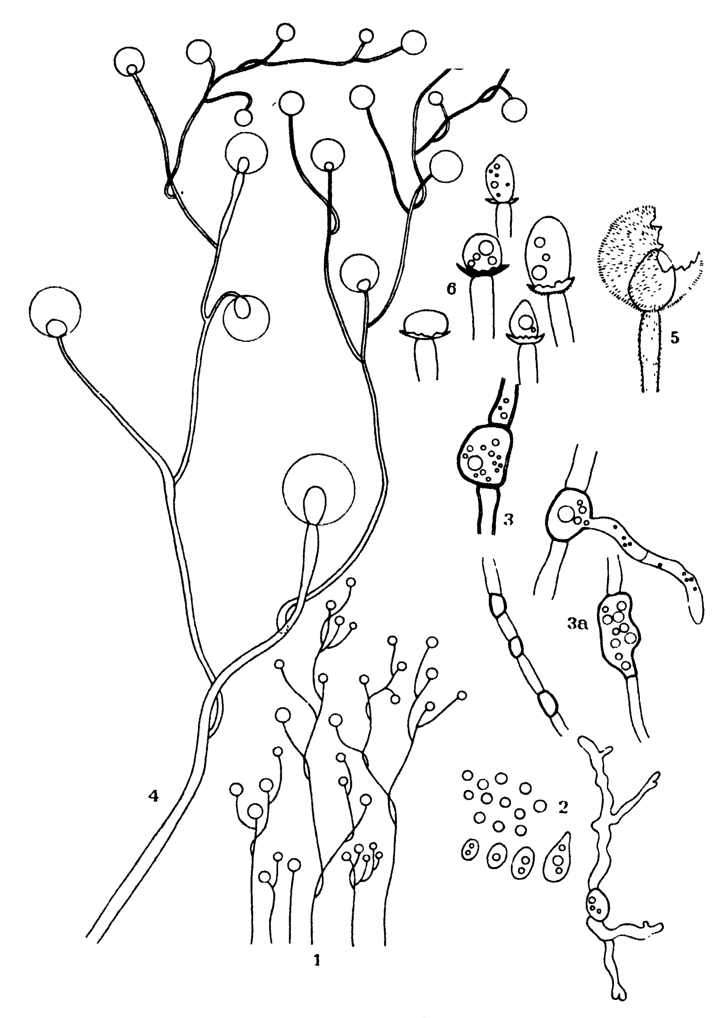


Abb. 1. *Mucor Jansseni*. 1. und 4. Verzweigung der Sporangienträger; Vergr. 30 mal bzw. 120 mal. 2. Sporen, z. T. gequollen; Vergr. 350 mal. 3. Chlamydosporen; Vergr. 350 mal. 5. Oberfläche des Sporangium; Vergr. 450 mal. 6. Columella; Vergr. 450 mal. Weitere Erklärungen im Text.

Mycels entstehen, weitaus am häufigsten jedoch am Substratmycel und besonders reichlich an submers in Nährflüssigkeit wachsendem Mycel. Die Sporangienträger verzweigen sich anfangs sympodial, die Zweige schließen jeweils mit einem Sporangium ab. Die Seitenäste werden mit

zunehmender Ordnungszahl immer schwächer und auch kürzer, die Sporangien immer kleiner (Abb. 1, Fig. 4). Während die Sporangien der Hauptäste zahlreiche Sporen enthalten, schließen die kleinen Sporangien oft nur 2 bis 8 Sporen ein, manchmal findet sich nur eine einzige Spore vor.

Häufig entspringen unterhalb eines Sporangiums kleine, sogenannte Nebensporangien, das ganze Astsystem ruft dann den Eindruck einer racemösen Verzweigung hervor. Dies findet sich besonders in älteren Kulturen.

Die Sporangien sind kugelig, die Größe sehr verschieden, im Mittel etwa 45 bis 75 μ Durchmesser. Doch kommen gelegentlich auch größere bis zu 90 μ vor. Die kleinen Sporangien, die an den Endzweigen der Astsysteme sitzen, gehen in ihren Abmessungen bis auf 15 bis 20 μ im Durchmesser herab. Die anfangs hellblaugraue Farbe der Köpfchen weicht bald einer tief dunkelblauschwarzen Tönung, die durch das Nachdunkeln der durchscheinenden Sporen, sowie durch die reichlich abgesonderten Inkrustationen noch wesentlich verstärkt wird. Die Oberfläche des Sporangiums sieht feinstachelig aus und, da auch hier die Anordnung der Kriställchen, es handelt sich wahrscheinlich um Oxalate, ziemlich regelmäßig in Linien erfolgt, auch streifig (Abb. 1, Fig. 5). Die Sporangienwand ist nicht zerfließlich, sondern brüchig. Es bleibt immer ein Kragen in Form mehr minder größerer Bruchreste an der Columella zurück. Die Kriställchen sind nadel-spieß-stäbchenförmig. Die Columella ist in ihrer Form und Größe sehr variabel (Abb. 1, Fig. 6). Man findet alle Übergänge von rein kugeliger Gestalt bis kegelförmiger Form. In sehr jungen Sporangien ist sie hellgrau und hyalin, später bräunlich mit schwach bläulichem Stich; dann enthält sie auch reichlich Fettröpfchen und Vakuolen. Die blaue Farbe scheint hier, ähnlich wie bei den Blaufäulepilzen des Holzes, auf das Prinzip der „Trüben Medien" zurückzuführen sein. Für die Kugelform wurden 12 bis 65 μ, im Mittel 45 μ, für die Ovalform 15 bis 55 μ Längs- und 7 bis 50 μ Querdurchmesser gemessen.

Besonderer Erwähnung bedürfen die in Nährflüssigkeit bei submersem Wachstum auftretenden Wuchsformen. Neben normal ausgebildeten Hyphen finden sich zahlreiche Übergänge bis zum typisch hefeartigen Sproßverband. Wir sind, um jedem Einwand zu begegnen, von Einzelsporen ausgegangen. Sporenemulsionen wurden soweit verdünnt, bis sich in der feuchten Kammer im hängenden Tropfen nur eine Spore befand. Diese bildete nach dem Auskeimen alsbald Kugelzellen, die schließlich sproßartige Verbände ergaben, deren Einzelelemente verschiedene Größen hatten und alle Übergänge von der Kugelform bis zu langgestreckten Sproßzellen zeigten. Davon wurde mit einer Kapillare angesaugt und das Impfgut durch Abbrechen der

Kapillarspitze in 3 % Traubenzucker-Peptonlösung gebracht. Es wurde streng steril gearbeitet. Es wuchsen neben typischen Hyphen reichlich Kugelzellen und Chlamydosporen. Die Hyphen zeigten Arthrosporen-

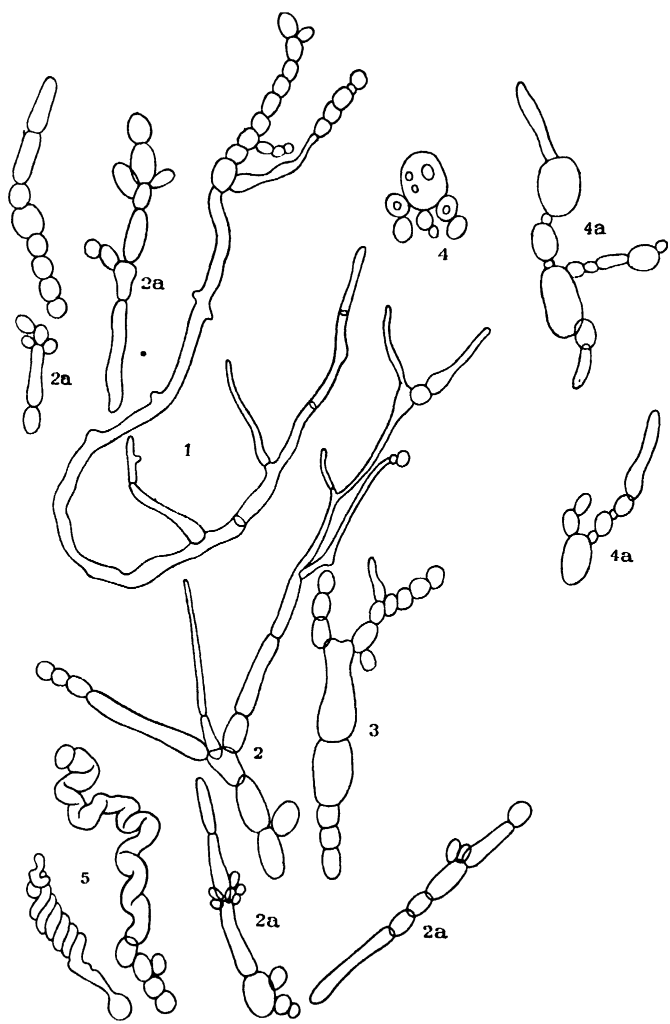


Abb. 2. *Mucor Jansseni*. 1. Arthrosporenbildung; 2. Pseudomycel und Blastosporen; 3. Riesenzellen; 4. Kugelzellen; 5. Spiralwachstum. Weitere Erklärungen im Text. Vergr. aller Abb. etwa 750 mal.

bildung (Abb. 2, Fig. 1), d. h. aus der primär entstandenen Hyphe ging durch Zerfall in der Wachstumsrichtung eine Kette von Arthrosporen, die untereinander und mit der Hyphe im Zusammenhang blieben, hervor. Die Kugelzellen konnten so aussprossen, daß sich

die entstandenen Langsprosse durch weitere Sprossung ganz einseitig nach einer Richtung hin erstreckten und so der Eindruck eines Pseudomycels entstand (Abb. 2, Fig. 2). Die Langsprosse erzeugten mitunter in der Gegend ihrer Berührungsstellen Kurzsprosse, die dann ihrer Entstehung und Anordnung nach typische Blastosporen waren (Abb. 2, Fig. 2a). Damit entstand durchaus der Eindruck einen Sproßpilz, etwa eine Art der Gattung *Candida*, vor sich zu haben. Daneben finden sich zahlreiche Chlamydosporen mit derber Membran. Auch Riesenzellen (Abb. 2, Fig. 3) von bedeutenden Abmessungen kommen vor. Alle die verschiedenen Elemente sind voll von Reservestoffen, unter denen glykogenartige Stoffe und fettes Öl den Hauptteil bilden. Bringt man ein wenig nur Kugelzellen enthaltendes Impfmaterial mit Hilfe von Glaskapillaren auf Brotnährboden, so zeigt der Pilz in Kürze seine alte charakteristische Wuchsform. Auf Bierwürzegelatine gebracht, keimen die Chlamydosporen ohne weiteres zu Hyphen aus, während die Kugelzellen ein Zwischenstadium bilden. Die Kugelzelle schwillt zu einer Blase von doppelter Größe an, aus der dann eine kurze Hyphe herauswächst, die aber sofort wieder Kugelzellen bildet (Abb. 2, Fig. 4 u. 4a). Erst nach einiger Zeit, offenbar nach Gewöhnung an die Verhältnisse in dem neuen Nährboden, tritt die normale Wuchsform auf. Eigenartig sind die spiraligen Wuchsformen, die gelegentlich in Traubenzuckerlösungen auftreten (Abb. 2, Fig. 5). Meist ist es eine kurze Hyphe oder ein Langsproß, der ganz regelmäßig spiralig gewunden beobachtet wird. Über das Zustandekommen dieser eigenartigen Wuchsform kann vorläufig nichts Näheres ausgesagt werden.

Auch über das sexuelle Verhalten des Pilzes wurden Versuche angestellt, die aber ohne eindeutiges Ergebnis blieben. Trotz Anwendung verschiedener Nährböden, vor allem solcher, die mit Erfolg zum Nachweis der Ascosporenbildung bei den Sproßpilzen dienen, konnten keine Zygoten erhalten werden. Die Versuche mit Gorodkowaagar, Karotte, Gipsblöckchen sowie der Nährlösung nach *Wöltje*, letztere unter Zusatz von 5, 10, 15 und 30% Saccharose und Vitaminbeigaben in Form von Hefeextrakt blieben ohne Ergebnis. Auch die Kombination der verschiedenen Stämme untereinander blieb bisher erfolglos. Es wurde auch versucht, Bastardzygoten zu erhalten. *Lendner* gibt an, daß *Mucor Jansseni* vielleicht in die Nähe von *Mucor fragilis* zu stellen ist. Mehrfache Kombinationen von *M. Jansseni* mit *Mucor fragilis* blieben ohne Erfolg. Auch Kombinationen mit *Mucor luteus* + u. —, *Absidia glauca* + u. — sowie *Mucor mucedo* + u. — ließen nichts Sicheres erkennen. Einmal bildete der *Stamm Zöptau* mit *M. luteus* — Gebilde aus, die vielleicht als Anlagen von Bastardzygoten gedeutet werden könnten. Doch kam es nie zur Ausbildung vollständiger Zygoten. Dieser Versuch könnte dahin ausgewertet werden, daß *M. Jansseni*

Stamm Zöptau die Plusform einer heterothallischen oder besser diözischen Rasse ist. Die übrigen Stämme sind, den Ergebnissen nach zu schließen, weder homothallisch (monözisch) noch heterothallisch (diözisch), sondern waren Neutralformen. Eine endgültige Entscheidung wird bei *Mucor Janssemi* wohl schwer herbeizuführen sein, da der Pilz doch recht selten ist und offenbar noch sehr viel seltener in seine Plus- oder Minusformen getrennt in der Natur vorzukommen scheint.

III. Physiologische Merkmale.

1. Zuckervergärung (Gas- und Säurebildung). Die Prüfung auf diese Merkmale wurde im Vorversuch mit dem *Einhorn*schen Gärrohr vorgenommen. Zum Hauptversuch verwendeten wir Gärröhrchen (Glockenmethode). Als Versuchsflüssigkeit diente folgende Nährlösung: 2% Pepton-Witte in destilliertem Wasser, abgefüllt zu 100 ccm, sterilisiert und mit 5% des durch Umkristallisieren gereinigten Zuckers versetzt. Je 5 ccm der durch zweimaliges Erhitzen auf 100° C sterilisierten Flüssigkeit wurden in Proberöhrchen, die mit dem Gärröhrchen versehen waren (vorher im Trockenschrank sterilisiert), steril abgefüllt. Die mit Glaskappen versehenen Röhrchen werden nochmals bei 100° C sterilisiert, wodurch gleichzeitig die Luft aus dem Gärröhrchen vertrieben wird. Nach dem Erkalten wird 1 ccm einer sterilen Lackmuslösung nach *Kubel-Thiemann* hinzugefügt. Es wird, um später die Säurebildung oder einen Umschlag nach der alkalischen Seite hin genau feststellen zu können, mit $^1/_{10}$ n NaOH oder $^1/_{10}$ n Sodalösung auf den Neutralpunkt eingestellt. Die Lösung zeigt, vermutlich durch das Pepton, manchmal eine schwach saure Reaktion. Um vergleichbare Werte zu erhalten, wurde mit einer 1 ccm-Pipette jeweils ein Tropfen einer Sporenemulsion verimpft. Die Emulsion wurde durch Überschichten einer jüngeren Agarkultur mit physiologischer Kochsalzlösung und leichtes Schütteln erhalten. Es hatte sich gezeigt, daß immer Sporen in genügender Menge durch diesen Vorgang trotz der Sprödigkeit und Festigkeit der Sporangiumwand erhalten werden. Geprüft wurden folgende Zucker: Glucose, Fructose, Mannose, Galaktose, Saccharose, Maltose, Lactose und Raffinose. Auch für die *Mucoraceae* gelten die von *Kluyver* (6) für Hefepilze gefundenen Gesetzmäßigkeiten der Zuckervergärung, soweit wir bisher feststellen konnten.

In allen Zuckerarten trat Säurebildung auf, wie der Lackmusumschlag nach rot anzeigte. Gas wurde dagegen nur in Glucose, Fructose, Mannose, Maltose und Galaktose gebildet. Die Versuche wurden in mehreren Serien bei 18, 22 und 37° C durchgeführt. Bei 18 und 22° C tritt die Säuerung am 2., die Gasbildung schon am 3. Tage ein, der Pilz wächst rasch und kräftig heran. Bei 37° C geht der Pilz nur sehr schwer und langsam an, zeigt nur schwaches Wachstum und starke Beeinträchtigung aller Lebensfunktionen.

Anfangs wird ziemlich viel Säure gebildet, am stärksten in den bis zur Gasbildung abgebauten Zuckerlösungen. Da stets mit gleichen Mengen gearbeitet wurde, konnten durch Titration mit $^1/_{10}$ n NaOH gegen Lackmus Vergleichswerte erhalten werden. Am meisten Säure

entstand in der Maltoselösung, dann in Mannose, Glucose, Fructose. In Galaktose entstand nur wenig Säure entsprechend der geringeren Gasbildung. Schwächer noch war die Säurebildung in Saccharose, Raffinose und sehr schwach in der Lactoselösung.

Merkwürdigerweise blieb aber die Säure nicht erhalten. Nach 3 bis 4 Wochen machte die Rotfärbung des Lackmus einer immer stärker werdenden Violett- und schließlich Blaufärbung Platz. Nach 6 Wochen war auch die Maltoselösung deutlich blau. *Mucor Jansseni* ist offenbar in der Lage, auch die gebildete Säure nach Aufzehren des Zuckers weiter zu verarbeiten oder sonst irgendwie zu binden, so daß die Säure wieder verschwindet. Und nun zeigte sich gerade das umgekehrte Verhältnis. Die alkalische Reaktion war in der Lactose-, Raffinose- und Saccharoselösung am stärksten; bei der Titration auf den Neutralpunkt wurden 0,35 bis 0,40 ccm $^1/_{10}$ n HCl gebunden, während bei den übrigen Zuckerarten nur 2 bis 6 Tropfen $^1/_{10}$ n HCl nötig waren. Am wenigsten wurde von der Maltoselösung gebraucht, wo nach 2 Tropfen der Neutralpunkt gegen Lackmus erreicht war. Gleichzeitig verschwand das Gas in allen Gärröhrchen bis auf eine kleine Blase, ob durch Absorption durch die Flüssigkeit oder Assimilation durch den Pilz kann nicht gesagt werden. Vielleicht entstehen bei der Verwertung des Peptons Zwischen- oder Endprodukte alkalischer Reaktion, die sowohl die Änderung der Reaktion bedingen, als auch das CO_2 binden, womit dann vielleicht giftig wirkende Stoffe unschädlich gemacht würden. Weitere Untersuchungen wären sicher wünschenswert.

2. *Temperatureinfluß. M. Jansseni* wächst noch bei 4 bis 6° C, allerdings nur sehr langsam und beinahe nur Substratmycel bildend. Bei 0° C keimten die Sporen noch aus, setzten aber das Wachstum nicht fort. Bei 16, 18, 20, 22 und 25° C wächst er sehr gut. Hier liegt auch sein Optimum, wenn auch schwer zu entscheiden ist, ob ein Unterschied bei 22 und 25° C merklich in Erscheinung tritt. Bei 30° C geht die Kultur noch rasch an, der Rasen bleibt aber niedrig, 1 bis 3 mm. Bei 37° C und bei 40° C geht *M. Jansseni* nur mehr sehr langsam an und zeigt nur spärliches Wachstum als Substratmycel. Über 45° C stellt er das Wachstum ein, wird aber nicht geschädigt, sondern wächst, auf Zimmertemperatur gebracht, rasch heran. Die Tötungstemperatur der Sporen liegt bei 65° C. Dieses wurde mit Sporenemulsionen im Wasserbad festgestellt. 10 Minuten dauerndes Erhitzen, die Zeit von da an gerechnet, in der ein Thermometer in der gleichen Menge Flüssigkeit diese Temperatur anzeigte, schädigte die Sporen nicht. Nach 20 Minuten keimten noch vereinzelte Versuchsröhrchen aus, nach 30 und 40 Minuten nicht mehr, während die unbehandelten Kontrollröhrchen in allen Fällen angingen. Bei 70° C genügte 10 Minuten langes Erhitzen, um

die Sporen abzutöten. Ebenso waren Brot- und Karottenkulturen nach dieser Zeit fast immer abgetötet, wie durch Abimpfen auf neue Nährböden festgestellt werden konnte.

3. Einfluß des p_H-Wertes. Der für das charakteristische Wachstum günstigste p_H-Wert lag bei $p_H = 5$, doch zeigt der Pilz im ganzen einen ausgedehnten Wachstumsbereich. So bildete sich in einer alkalischen Fleischbrühe mit 1 % Traubenzucker und einem p_H-Wert von 7,9 sehr rasch ein reichliches submerses Mycel, während in derselben Brühe, aber mit $p_H = 6$ ein sehr viel schwächeres Mycel wuchs. Bei $p_H = 4,5$ war das Wachstum ähnlich wie bei $p_H = 7,9$. Es scheint also so zu sein, daß der Pilz sowohl im sauren als auch im basischen Bereich je einen optimalen p_H-Wert bevorzugt. Dies würde übrigens eine Bestätigung unserer Befunde über das Verhalten bei der Gärung bedeuten.

4. Lebensdauer. Trotz der Chlamydosporenbildung verträgt *M. Jansseni* keine zu langandauernde Austrocknung. In der Regel lebt der Pilz auf Brot in Röhrchen mit Watteverschluß 8 Monate, auf Bierwürzeagar 12 bis 14 Monate. Nach 18 Monaten hatte er seine Keimfähigkeit eingebüßt und auch eine Durchtränkung des Nährbodens mit Bierwürze brachte ihn nicht mehr zum Auskeimen. Immerhin zählt er zu den widerstandsfähigeren *Mucor*-Arten.

5. Einfluß des Lichtes. Der Einfluß des Lichtes scheint sich dahin auszuwirken, daß die Verzweigung dunkel gehaltener Kulturen etwas früher und stärker einzutreten pflegt. Später sind Unterschiede im Wachstum nicht mehr feststellbar. Immerhin sind auch hierbei gewisse Erscheinungen bemerkenswert. Es wurden drei Versuchsreihen aufgestellt. Versuchsreihe I blieb bei Zimmerhelligkeit, Versuchsreihe II und III wurden sofort nach dem Abimpfen bei völliger Dunkelheit aufbewahrt. Nach 3 Tagen wurde die Versuchsreihe II auf 1 Minute der Zimmerhelligkeit ausgesetzt, nach 8 Tagen alle drei Reihen miteinander verglichen. Reihe I hatte einen wohlausgebildeten Rasen, doch waren die Sporangienträger nur mäßig verzweigt, im ganzen war der Rasen hellgrau. Reihe II glich der Reihe I, doch war die Verzweigung der Sporangienträger unserem Empfinden nach wesentlich stärker, auch war der Rasen etwas niedriger. Reihe III zeigte nur sehr wenige, reichlich verzweigte Sporangienträger, der Rasen war niedrig und stark mit weißem Luftmycel untermischt. Daraus geht hervor, daß die kurze Lichteinwirkung doch als Reiz in der Richtung eines besseren Wachstums, vor allem aber einer reichlicheren Sporangienbildung gewirkt hat. 3 Wochen alte Kulturen der drei Versuchsreihen zeigten aber keine Unterschiede mehr.

6. Sonstige Beobachtungen. *M. Jansseni* verflüssigt Gelatine, allerdings erst in älteren Kulturen. Vermutlich werden durch Autolyse abgestorbener Hyphen Gelatine verflüssigende Fermente frei. Milch wird

innerhalb 8 bis 12 Tagen zum Gerinnen gebracht, was wohl auf die Säurebilduhg zurückzuführen ist. Lackmusmilch zeigte anfangs kräftige Rotfärbung, die mit dem Alter der Kultur abnahm und einer schwachen Blaufärbung Platz machte. Die Natur der Säuren konnte nicht näher untersucht werden. Stärke wird geringfügig verzuckert, wie aus den positiven Zuckernachweisen hervorging. Kontrollröhrchen mit der gleichen Stärkelösung unter den gleichen Bedingungen gehalten blieben, auf Zucker geprüft, negativ. Die Sporangienträger sind phototropisch positiv, sie wachsen dem Licht zu. Dabei sind manche Sporangienträger scheinbar phototropisch negativ, indem sie von der Lichtquelle wegwachsen. Genaue Beobachtung zeigt aber, daß diese Träger auf Stellen zuwachsen, an denen das Licht stärker an der Glaswand des Kulturgefäßes reflektiert wird. Zu großer Wassergehalt des Nährbodens und der Luft gibt Anlaß zur Bildung von Kümmerformen innerhalb der Sporangienträger und läßt das Mycel mit zahllosen Tröpfchen bedeckt erscheinen. Auch bezüglich der Feuchtigkeit ist damit ein Minimum, Optimum und Maximum feststellbar, das übrigens mit der Züchtungstemperatur in Beziehung steht. Bei Temperaturen von 25° C kann eine vermehrte Feuchtigkeit ohne bemerkenswerte Erscheinungen ertragen werden, während dieselbe Feuchtigkeit des Nährbodens bei Zimmertemperatur (16 bis 18° C) bereits zur Ausscheidung von Tröpfchen führt.

Zusammenfassung.

Über *Mucor Jansseni Lendner*, von dem mehrere Stämme aus verschiedenen Gegenden isoliert wurden und dessen Beschreibung in der Literatur unvollständig ist, werden genauere Angaben über sein morphologisches und physiologisches Verhalten gemacht.

Literatur.

1) *Lendner, A.*, Bull. Herb. Boissier, 2e série, t. VII, 1907. — 1a) *Derselbe*, Les Mucorinées de la Suisse. Bern 1908. — 2) *Ling-Young, M.*, Etude biologique des phénomènes de la sexualité chez les Mucorinées. Rev. gén. de Bot. **42**, 144, 1930; **43**, 30, 1931. — 3) *Linnemann, G.*, Flora oder Allgemeine Bot. Zeitung, N. F., **30**, 176, 1936. — 4) *Zycha, H.*, Mucorineae in Kryptogamenflora der Mark Brandenburg, Band VIa. Leipzig 1935. — 5) *Janke, A.* u. *Zikes, H.*, Arbeitsmethoden der Mikrobiologie, S. 50. Dresden 1928. — 6) *Kluyver, A. J.*, Biochemische Suikerbepalingen. Delft 1914.

(Aus dem Botanisch-Mikrobiologischen Institut der Technischen Hochschule Karlsruhe.)

Untersuchungen über die Einwirkung von ultrakurzen Wellen auf Mikroorganismen. II.*

Von

Sigrid Hansen und **Wilhelm Schwartz.**

Mit 9 Textabbildungen.

(Eingegangen am 17. November 1942.)

Die Untersuchungen von *Sauter* und *Schwartz* (1939) haben gezeigt, daß elektromagnetische Wechselfelder eines Funkenstreckensenders mit hohen Spitzenspannungen und geringer mittlerer Feldstärke bei geringer Leitfähigkeit und nur mäßiger Erwärmung der Bakterienaufschwemmung die Zellen so stark schädigen können, daß sie absterben. Da die Temperaturen hierbei höchstens etwa um 16° C über die Anfangstemperatur anstiegen, also etwa 36° C erreichten, war die Möglichkeit einer nicht thermischen, also spezifischen Wirkung gegeben, wenn auch nicht bewiesen. Ferner ist aus dem Schrifttum bekannt, daß die Zellen einer Bakterienaufschwemmung im Kondensatorfeld eines ungedämpfte Schwingungen liefernden Röhrengerätes rascher abgetötet werden als die im Wasserbad bei derselben Temperatur (*Schliephake*, 1935).

In der Heilkunde werden Ultra-Kurzwellen (UKW.) seit geraumer Zeit verwendet, obwohl man sich über die Wirkungsweise nicht klar ist. Aus der Tatsache, daß die beim Patienten auftretende Wärmeempfindung als Dosismaß benutzt wird, darf ja nicht ohne weiteres geschlossen werden, daß in erster Linie die Wärmewirkung ausgenutzt wird. Die in der Praxis gebräuchlichen Apparate erzeugen teils gedämpfte (Funkenstreckensender), teils ungedämpfte (Röhrensender) Schwingungen. Arbeitet man mit ungedämpften Schwingungen, so ist die mittlere Feldstärke groß im Verhältnis zur maximalen, während bei gedämpften Schwingungen die mittlere Feldstärke klein, die maximale recht beträchtlich ist. Verwendet man Bakterienaufschwemmungen, so muß die Erwärmung der Aufschwemmung bei großen mittleren Feldstärken größer sein als bei kleinen. Selbstverständlich ist auch die Leitfähigkeit der Aufschwemmung von größter Bedeutung.

Im Anschluß an die bekannten Tatsachen sollte die Wirkung ungedämpfter UKW. bei extrem hohen mittleren Feldstärken und sehr

---

* Ausgeführt mit Unterstützung des Reichsforschungsrates und der Siemens-Schuckert-Werke, Berlin.

kurzen Behandlungszeiten untersucht werden. Es war ferner von Interesse zu untersuchen, ob mit den mittels eines Röhrengerätes zu erzeugenden gedämpften Hochfrequenzschwingungen dieselben oder ähnliche Wirkungen auf Bacterien ausgelöst werden können, wie es mit einem Funkenstreckensender in früher durchgeführten Versuchen der Fall war. Gleichzeitig sollte festgestellt werden, inwieweit die Leitfähigkeit der Aufschwemmung und Unterschiede des Schwingungsverlaufes beim Einsetzen der Schwingungen einen Einfluß auf die biologische Wirksamkeit haben.

Wir benutzten für unsere Untersuchungen folgende Stämme von Mikroorganismen:

Von der Reichsanstalt für Land- und Forstwirtschaft in Berlin erhielten wir: *Micrococcus candicans*, aus der *Kral*schen Sammlung in Wien; *Azotobacter chroococcum*, Stamm XV, isoliert vom Versuchsfeld in Dahlem. Die morphologischen und physiologischen Eigenschaften der beiden Stämme wichen von den bekannten Angaben nicht ab.

Ferner wurden aus *Erde* und aus *Milch Bakterien*-Stämme, und aus einem Schleimfluß ein *Hefe*-Stamm isoliert.

Die *Bodenbakterien* stammten aus Erdproben aus dem Botanischen Garten aus einer Bodentiefe von 5 bis 8 cm unter einer Rasenfläche. Je eine Spatelspitze dieser Erde wurde in einem Reagensglas in 10 ccm sterilem, destilliertem Wasser aufgeschwemmt und im Wasserbad erwärmt. Die Anfangstemperatur betrug 40° C. Der Wärmegrad des Wasserbades wurde binnen 10 Minuten um 10° erhöht, 1 Minute bei der erreichten Temperatur gehalten, um dann binnen weiterer 10 Minuten um weitere 10° erwärmt zu werden usf. bis zu 100° C. Am Ende jeder 11. Minute wurde ein Glas mit einer Probe aus dem Wasserbad herausgenommen und kurz geschüttelt. Nachdem sich die festen Teilchen abgesetzt hatten, wurden $^2/_{10}$ ccm der Aufschwemmung mit 10 ccm Fleischbouillongelatine in eine Petrischale gebracht. Nach einigen Tagen zeigten sich auf den Platten Bakterienkolonien, die verschieden hohe Temperaturen ausgehalten hatten. Sie wurden nach dem *Koch*schen Plattenverfahren rein gezüchtet. Die Stämme wurden so ausgewählt, daß sie Gelatine gar nicht oder nur sehr langsam verflüssigen und gegen höhere Temperaturen nicht allzu empfindlich sind.

Der in der vorliegenden Arbeit verwendete Stamm wurde *b* 90° benannt (Tabelle I und II). Die Erdprobe, aus der er gezüchtet wurde, war in der geschilderten Weise auf 90° erwärmt worden, wobei die Probe im ganzen 56 Minuten im Wasserbad verblieb. Die später geprüfte Hitzeresistenz zeigte, daß bereits bei Erwärmung auf 47° C 90% der Keime abstarben, während 42 bis 45° ohne nennenswerte Beeinflussung vertragen wurden.

Zur Gewinnung von *Milchsäurebakterien* ließen wir Magermilch bei Zimmertemperatur 3 Tage stehen. Eine Impföse des gesäuerten Materials wurde auf einen Gelatine- oder Agarnährboden gebracht und nach dem *Koch*schen Plattenverfahren in drei Folgen rein gezüchtet. Nach den morphologischen und physiologischen Eigenschaften ließ sich der aus Milch isolierte Bakterienstamm als *Streptococcus lacticus* (*Kruse*) einordnen (Tabelle I und II).

Die *Hefe* stammte aus dem Schleimfluß einer *Ulme*. Unter den verschiedenen Hefeformen, die sich auf der Würzegelatine entwickelten, wurde

ein Stamm mit annähernd runden, d. h. kugelförmigen Zellen zur Reinzucht ausgewählt.

Tabelle I. Morphologische Eigenschaften der Stämme *b* 90° und *Streptococcus lacticus (Kruse)*.

Eigenschaften	*b* 90°	*Streptococcus lacticus (Kruse)*
Form	Langstäbchen	Lanzettkokken, Streptokokken selten
Bewegung	unbeweglich	unbeweglich
Größe	1,9 bis 3,7 μ lang 0,6 bis 0,8 μ breit	1 μ lang, 0,5 bis 0,6 μ breit
Kolonieform ..	glatte runde Kolonien und Faserkolonien	kleine, glatte, weiße Kolonien an der Oberfläche größer als im Substrat
Gramfärbung .	positiv	negativ
Sporenbildung	ja	nein
Kapselbildung	nein	nein

Tabelle II. Physiologische Eigenschaften der Stämme *b* 90° und *Streptococcus lacticus (Kruse)*.

Nährboden	Verhalten von *b* 90° bei $t = 20°$	Verhalten von *Streptococcus lacticus (Kruse)*, $t = 37°$ C
Gelatine (Stichkultur)	nach 14 Tagen beginnt schwache Verflüssigung	—
Schräg-Agar + Bleiacetatpapier	keine Schwefelwasserstoffbildung	keine Schwefelwasserstoffbildung
Fleischbouillon	Trübung; es bildet sich ein fettiger Rand	deutliche Trübung
Trypsinbouillon	keine Indolbildung	Indolbildung
Drigalski-Agar	—	starke Gasbildung, Farbumschlag in rot
Neutralrottraubenzucker	geringe Gasbildung, keine Fluoreszenz	starke Gas- und Fluoreszenzbildung
Lackmus-Traubenzuckerlösung	—	starke Gasbildung und Farbumschlag in rötlichgelb
Lackmusmilch	schwache Blaufärbung, keine Koagulation	—
Methylenblaumilch ..	Reduktion, keine Koagulation	am 2. Tag Reduktion, Koagulation
Endo-Agar	—	keine Fluoreszenz
Stärkebouillon	keine Hydrolyse	am 7. Tag vollständige Hydrolyse
Nitratbouillon	Nitritbildung, keine Ammoniakbildung	Nitritbildung, keine Ammoniakbildung
Leberbouillon	schwache Trübung	Trübung; es bildet sich ein fettiger Rand
Blut-Agar (anaerob)	—	anaerob angewachsen

Bestimmung nach: *Lehmann-Neumann*, Atlas und Grundriß der Bakteriologie. München, Lehmann Verlag, 1912.

Außer diesen Reinkulturen wurde auch eine Mischkultur verwendet, wie wir sie in der Milch vorliegen haben[1].

Einwirkung ungedämpfter Schwingungen.

1. Versuchsanordnung.

Die elektrischen Schwingungen wurden mit dem Ultrakurzwellengerät „Ultra-Pandoros" der Siemens-Reiniger-Werke erzeugt. Der Ultra-Pandoros ist ein Röhrengenerator, in dem zwei Schwingungsröhren von Siemens & Halske, A.-G., Type GR I, hochfrequenzmäßig im Gegentakt arbeiten (Abb. 1).

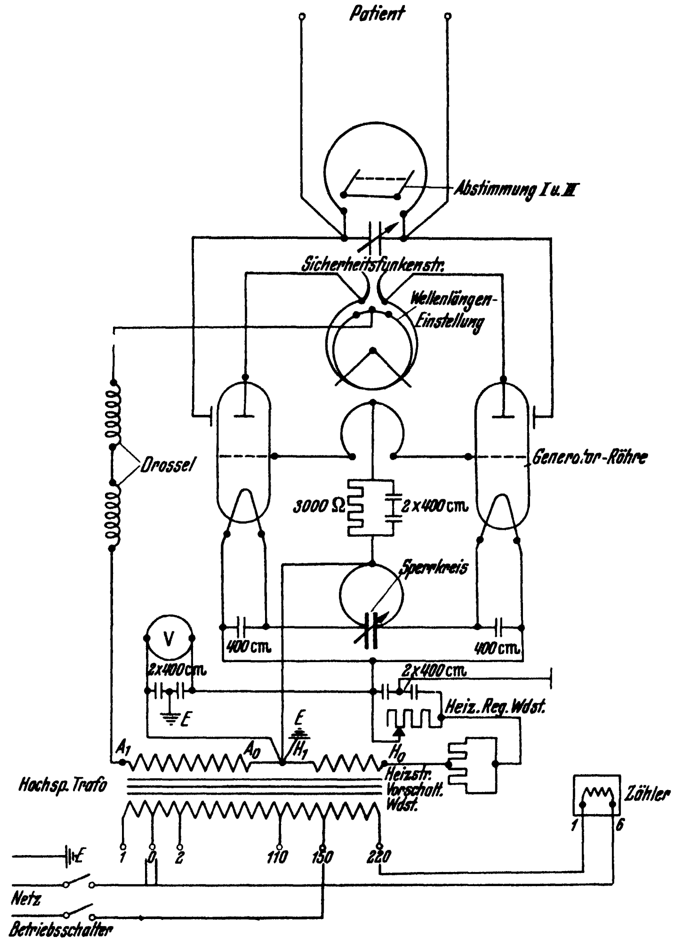


Abb. 1. Schaltungsschema für Versuche mit ungedämpften Schwingungen.

[1] Es bot sich hierbei neben guter Leitfähigkeit, die nicht nur durch NaCl-Ionen bedingt ist, auch eine Vergleichsmöglichkeit hinsichtlich der noch später zu erörternden Wärmeeinwirkung, die einmal durch UKW., in den Molkereien aber in Hocherhitzern entwickelt wird.

Durch Veränderung der Selbstinduktion des Primärschwingungskreises können Wellenlängen zwischen etwa 3,15 und 8 m eingestellt werden. Die Kurzwellenleistung beträgt zwischen 3,15 und 3,70 m über 300 Watt, zwischen 3,70 und 8 m über 600 Watt. Die Arme der für therapeutische Zwecke verwandten Schliephake-Elektroden wurden durch feste Kupferdrähte von 4 bis 4,6 mm Durchmesser und der aus der Zeichnung ersichtlichen Länge ersetzt, die zu den Versuchselektroden führten (Abb. 2). Die obere Elektrode bestand aus einem Hohlzylinder von 60 mm lichter Weite, 175 mm Höhe, 5 mm Wandstärke und einer aufschraubbaren Platte, die

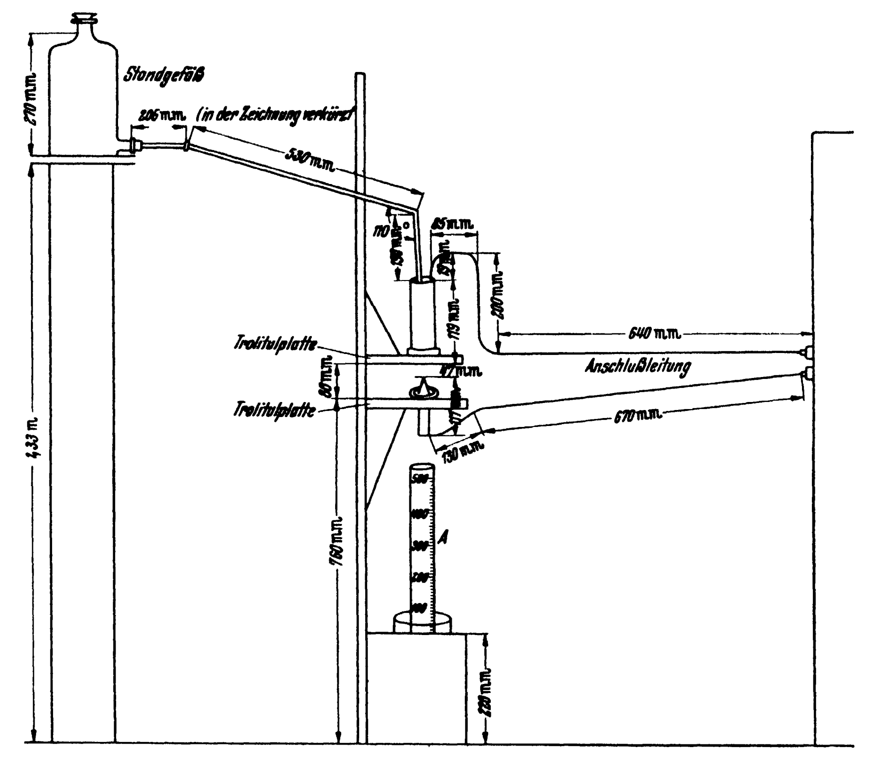


Abb. 2. Versuchsanordnung für Versuche mit ungedämpften Schwingungen.

konzentrisch einen kegelförmigen Vorsprung mit einer 1 mm weiten Düse besaß. Aus der Düse lief die zu behandelnde Bakterienaufschwemmung zur unteren Elektrode, traf genau auf die Spitze der unteren Elektrode und lief hier an dem Kegel ab und durch die vier Öffnungen in den Hohlzylinder der unteren Elektrode von 7,5 mm lichter Weite (Abb. 3).

Von der Bakterienaufschwemmung wurde eine Probe abgefüllt, RK I *, sie ergab den Keimgehalt der unbehandelten Aufschwemmung. Die Elektroden sowie das ausgedämpfte Standgefäß wurden in der aus der Zeichnung ersichtlichen Weise angeschlossen, die Klemmschraube am Zuleitungsrohr angezogen und die Aufschwemmung eingefüllt. Dann wurde die Klemm-

* Siehe die Bezeichnungen in Tabellen III bis V.

schraube etwas geöffnet und so viel Aufschwemmung in die Elektrode gefüllt, daß die Flüssigkeit 3 bis 4 cm hoch stand, was etwa 60 bis 90 ccm entsprach. Mittels Regulierung an der Klemmschraube erreichte man, daß die zufließende Menge gleich der abfließenden war und das Volumen in der Elektrode konstant blieb. Die im Rohr der unteren Elektrode abfließende Aufschwemmung wurde in einem 500-ccm-Meßzylinder von 50 mm lichter Weite und 360 mm Höhe aufgefangen. Wenn 200 ccm Aufschwemmung darin aufgefangen waren, wurde die erste Probe DK I genommen, die anzeigt, ob Bakterien an der Gefäßwand hängenbleiben bzw. neue dazu

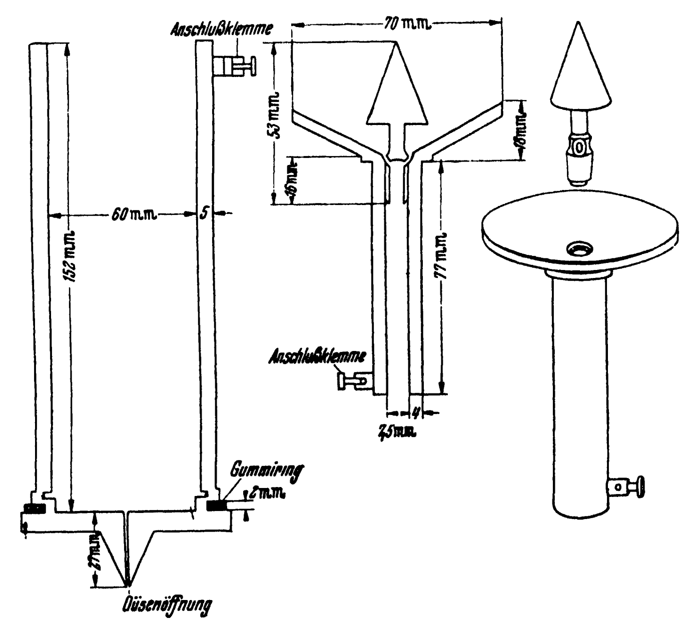


Abb. 3. Elektroden für Versuche mit ungedämpften Schwingungen.

kommen. In einem sterilen und abgeflammten Reagensglas wurde 1 Minute lang die von der unteren Elektrode abfließende Aufschwemmung aufgefangen, Glas und Watte abgeflammt und das Glas wieder verschlossen.

Nun wurde der Apparat eingeschaltet und die Heizspannung auf 20 Volt eingestellt. Die Wellenlänge lag fest bei 5,54 m. Sie wurde am Anfang der Versuchsreihe eingestellt und später nicht mehr verändert. Die Schwankungen der Wellenlänge waren unbedeutend, sie lagen zwischen 5,54 und 5,50 m. Die Wellenlänge wurde indirekt aus der Frequenz bestimmt, die mit einem Frequenzmesser, Type FM 5, Meßbereich 3,0 bis 125 MHz, der Firma Dr. Steeg & Reuter G. m. b. H., Bad Homburg, gemessen wurde.

Die Abstimmung erfolgte mittels eines Kupferdrahtringes vom Durchmesser 125 mm und 2 mm Drahtdicke, in den eine 6 Volt/0,04 Amp.-Lampe eingeschaltet war. Im Hochfrequenzfeld leuchtet die Birne auf. Der Kupferdrahtring wurde im Abstand von etwa 30 bis 35 cm senkrecht über die Elektrodenzuleitung in unmittelbare Apparatnähe gebracht, wobei die Ebene der Drahtschleife parallel zur Ebene der Elektrodenzuleitung lag. Jetzt drehte man an dem Knopf „Abstimmung". Bei einer reinen Welle

erhielt man, wenn man den Knopf durch die ganze Meßskala drehte, nur an einem Punkt hellstes Aufleuchten der Birne, auf allen anderen Abschnitten der Skala leuchtete die Birne nicht. Durch Verstellen der Knöpfe „Abstimmung" und „Sperrkreis" erhielt man diese Einstellung. Den Knopf „Sperrkreis" brauchte man später nicht mehr zu bedienen, mit dem Knopf „Abstimmung" mußte jeweils bei Beginn des Versuchs die Einstellung erfolgen.

Die an den Versuchselektroden liegende Spannung wurde mit dem *Starke-Schroeder*-Spannungsmeßinstrument, Type Pet 85 für 25 kV Gleich-, Wechsel- und Hochfrequenz gemessen. Sie betrug 1400 Volt, wobei zu beachten ist, daß die Kapazität des Meßinstruments größer war als die der Versuchselektroden, die Spannung an den Elektroden also wahrscheinlich größer war. Das Meßinstrument lag, weil es die Spannung zu stark herabsetzt, während der Versuche nicht an den Elektroden.

Wenn seit Beginn des Einschaltens im Meßzylinder (*A*) 500 ccm aufgefangen worden waren, wurde die erste Probe bestrahlter Aufschwemmung genommen, anschließend die Temperatur gemessen, indem man ein Toluolthermometer in die aus der unteren Elektrode ablaufende Flüssigkeit hielt. Das Thermometer in das Feld zu bringen war nicht ratsam, weil dadurch einmal das Feld verzerrt wird, zudem auch Funkenüberschläge auf das Thermometer auftreten können. Die nächsten Bestrahlungsproben, mit D II, D III, D IV usw. bezeichnet, wurden je nach weiteren 500 ccm genommen. Alle Proben wurden sofort nach Entnahme im Impfkasten so weiterverarbeitet, daß $^1/_{10}$, 1 und 10 ccm mit sterilem Wasser auf je 100 ccm verdünnt und davon $^1/_{10}$ und $^1/_2$ ccm zum Plattengießen verwendet werden. In jede der sechs Petrischalen kamen 10 ccm 14%ige verflüssigte Fleischbouillongelatine, dazu die angegebenen Aufschwemmungsmengen, die mit dem Nährboden sorgfältig vermischt wurden. Nach 2 Tagen wurden die Keime auf den Platten erstmalig gezählt, ebenso an den beiden folgenden Tagen. Aus dem Keimgehalt einer Platte wurde der Keimgehalt von 1 ccm Aufschwemmung berechnet. Die Genauigkeit dieser Bestimmung betrug $\pm$ 10%. Als 4. Stufe wurden, wenn weitgehende Abtötung erwartet wurde, von der gleichen Aufschwemmung $^1/_{10}$ und $^2/_{10}$ ccm in je eine Petrischale gebracht und in gleicher Weise behandelt.

Der Apparat wurde ausgeschaltet, wenn die Flüssigkeit im Standgefäß (Bodendurchmesser = 170 mm) nur noch 50 mm hoch stand. Nach Abschalten des Apparats wurde eine Probe unbehandelter Aufschwemmung aus dem Standgefäß genommen, mit RK II bezeichnet, um Änderungen des Keimgehalts während der Versuchsdauer berücksichtigen zu können. Der Prozentgehalt der Abtötung ist auf RK I bezogen.

Jeweils unter Konstanthaltung der übrigen Faktoren wurden folgende Veränderliche geprüft:

Heizspannung, die an der Kathode liegt: Die Heizspannung betrug zweckmäßig 19 bis 20 Volt; bei höherer Voltzahl sprangen an den Elektroden Funken über, wodurch die Spitzen der Kegel abschmoren. Geringere Heizspannung setzte die Temperatur herab.

Elektrodenabstand: Der Elektrodenabstand wurde zu 44 mm zwischen den Kegelspitzen gewählt. Hierbei sprangen allgemein bei obiger Heizspannung keine Funken über. Bei größerem Abstand ging die Temperatur herunter.

Durchflußgeschwindigkeit durch die Elektrodendüse und Flüssigkeitshöhe in der oberen Elektrode, sowie die Konstanthaltung dieser Höhe:

Die Flüssigkeitshöhe in der oberen Elektrode soll konstant gehalten werden, da sie die Durchflußgeschwindigkeit bestimmt. Eine Höhe zwischen 3 bis 5 cm wurde als beste Bedingung herausgefunden.

Frequenz bzw. Wellenlänge: Die Frequenz wurde willkürlich zu 54,3 bis 54,5 MHz gewählt, das entspricht einer Wellenlänge von 5,52 bis 5,50 m. Diese wurde konstant eingehalten. Nach früheren Versuchen von *Sauter* und *Schwartz* (1939) ist die Wellenlänge innerhalb gewisser Grenzen ohne Bedeutung für die Bakterienabtötung.

2. *Ergebnisse.*

a) Versuche mit einer wässerigen Bakterienaufschwemmung.

Verwendete man abgekochtes, filtriertes, steriles Leitungswasser zur Herstellung einer Aufschwemmung von *Streptoccocus lacticus (Kruse)*, so ließ sich keine Abtötung feststellen. Die Temperatur stieg auf 30 bis 31° C maximal an. Setzte man der Aufschwemmung Kochsalz zu, auf 1 Liter Aufschwemmung 1 g, so erwärmte sich die Aufschwemmung infolge der größeren Leitfähigkeit stärker. Die Temperaturen

Tabelle III. Verhalten einer Aufschwemmung von *Streptococcus lacticus (Kruse)* mit 0,1% NaCl-Gehalt.

Auf den Keimgehalt geprüfte Proben	Aufschwemmungstemperatur am Ausfluß gemessen t °C	Keimgehalt der Proben, berechnet auf 1 ccm	Abtötung in %
RK I	22,5	$5{,}2 \cdot 10^6$	
D I	49	$3{,}8 \cdot 10^6$	28
D II	58	$6{,}1 \cdot 10^5$	88
D III	64	$6{,}9 \cdot 10^4$	99
D IV	55	$4{,}5 \cdot 10^6$	14
D V	60	$1{,}9 \cdot 10^6$	64
D VI	60	$2.1 \cdot 10^6$	59

Tabelle IV. Versuche mit Magermilch.

Auf den Keimgehalt geprüfte Proben	Milchtemperatur am Ausfluß gemessen t °C	Keimgehalt der Proben, berechnet auf 1 ccm Milch	Abtötung in %
Versuch 4.			
RK I	18	$4{,}8 \cdot 10^5$	
D I	56	$4{,}1 \cdot 10^4$	91
D II	59	$7{,}5 \cdot 10^4$	84
D III	65	$3{,}5 \cdot 10^3$	99
RK II		$7 \cdot 10^5$	
Versuch 6.			
RK I	18	$1 \cdot 10^6$	
D I	44	$8 \cdot 10^5$	20
D II	57	$2 \cdot 10^3$	99,8
D III	55	$2 \cdot 10^4$	98
D IV		$6 \cdot 10^5$	40
RK II		$1 \cdot 10^6$	

Tabelle IV (Fortsetzung).

Auf den Keimgehalt geprüfte Proben	Milchtemperatur am Ausfluß gemessen t °C	Keimgehalt der Proben, berechnet auf 1 ccm Milch	Abtötung in %
Versuch 16.			
RK I	11	$4{,}3 \cdot 10^6$	
D I	50	$2{,}9 \cdot 10^6$	31
D II	55	$2{,}7 \cdot 10^6$	36
D III	55	$3{,}9 \cdot 10^6$	5
D IV	51	$3{,}7 \cdot 10^6$	10
D V	55	$1{,}3 \cdot 10^6$	88
D VI	58	$2{,}2 \cdot 10^6$	48
D VII	64	$4{,}4 \cdot 10^5$	89
D VIII	69	$2{,}8 \cdot 10^3$	99,9
D IX	60	$1{,}9 \cdot 10^4$	99,5
D X		$1{,}5 \cdot 10^6$	65
RK II		$8{,}5 \cdot 10^6$	

Tabelle V. Versuche mit Vollmilch.

Auf den Keimgehalt geprüfte Milchproben	Milchtemperatur am Ausfluß gemessen t °C	Keimgehalt der Proben, berechnet auf 1 ccm Milch	Abtötung in %
Versuch 3.			
RK I	14	$2{,}3 \cdot 10^5$	
D I	51	$3{,}7 \cdot 10^5$	0
D II	53	$6{,}3 \cdot 10^5$	0
D III	unterbrochen, Düse war durch Milchpfropf verstopft		
D IV	60	$1{,}3 \cdot 10^1$	99,9
D V	65	$7{,}5 \cdot 10^2$	99,6
D VI	64	$2{,}8 \cdot 10^2$	99,8
D VII	64	$2{,}6 \cdot 10^3$	99
D VIII	61	$2{,}2 \cdot 10^3$	99
Versuch 6.			
RK I	15	$9{,}6 \cdot 10^4$	
D I	62,5	$4 \cdot 10^3$	95,8
D II	61,5	$2{,}4 \cdot 10^3$	97,5
D III	61,5	$9{,}1 \cdot 10^2$	99
D IV	unterbrochen, Düse war durch Milchpfropf verstopft		
D V	59	$5{,}6 \cdot 10^3$	94
Versuch 15.			
RK I	13	$1{,}8 \cdot 10^5$	
D I	55	$6{,}5 \cdot 10^4$	63
D II	57	$2{,}2 \cdot 10^4$	87,8
D III	58	$4{,}4 \cdot 10^4$	75
D IV	60	$2{,}9 \cdot 10^4$	83,9
D V	59	$3 \cdot 10^4$	83
D VI	61	$5{,}9 \cdot 10^3$	96,7
D VII	62	$3 \cdot 10^3$	98
D VIII	64	$1.5 \cdot 10^2$	99.8

lagen zwischen 49 und 64° C (Tabelle III). Diese wie die folgenden Versuche zeigten eindeutig (Tabelle IV und V), daß der Prozentsatz der Abtötung mit der Erwärmung der Aufschwemmung im elektrischen Feld steigt und fällt. Der Abtötungsgrad ist von der erreichten Temperatur abhängig. Da die Aufschwemmung nicht nur im Feld, d. h. zwischen den Elektroden, sondern auch schon in der oberen Elektrode erwärmt wurde, da ferner die am Abfluß der unteren Elektrode gemessene Wärme nur annähernd den erreichten Wärmegrad angab und zudem erst nach jeder Probeentnahme festgestellt wurde, konnten Fehlmessungen von 1 bis 2° C vorkommen.

b) Versuche mit Mager- und Vollmilch.

Die Ergebnisse von 17 Versuchen mit Magermilch und 15 Versuchen mit Vollmilch entsprechen den bei den Bakterienaufschwemmungen erhaltenen (Tabelle IV und V). Eine 100 %ige Abtötung wurde in keinem Fall erzielt (Tabelle IV). Da überlegungsmäßig bei schnellem Temperaturanstieg die Keimgehalte der ersten D-Versuche niedriger sein müssen, wurde die Milch in einigen Versuchen auf 40° C vorgewärmt und dann mit UKW. behandelt. Die Ergebnisse bestätigten die Richtigkeit dieser Vermutung, jedoch waren die Verbesserungen unwesentlich. Sehr geringe, an „Kochgeschmack" erinnernde geschmackliche Veränderungen ließen sich bei einiger Übung in der behandelten Magermilch feststellen.

Die Ergebnisse der Vollmilchversuche entsprachen den Magermilchversuchen, der Fettgehalt der Milch beeinflußt die Keimschädigung nicht (Tabelle V). In einigen Versuchen wurde sogar eine 100 %ige Abtötung erreicht. Beim Arbeiten mit Vollmilch verstopfte sich leicht die Düse der Elektrode, so daß die Milch nur noch heraustropfte. Der Versuch mußte dann unterbrochen und der Milchpfropf entfernt werden. Der Geschmack der Vollmilch änderte sich durch die UKW.-Behandlung nicht.

Vergleicht man die absoluten Keimzahlen mit den zugehörigen Temperaturen, so zeigt sich, daß bei 55° etwa 10^5, bei 57 bis 58° etwa 10^4 Bakterien, bei 60° etwa 10^3, bei 64° 10^2 bis 10^0 Bakterien zurückbleiben, wenn man von 10^5 Keimen in 1 ccm Milch ausgeht. Liegt der Keimgehalt der Rohmilch höher, dann ändern sich die absoluten Zahlen.

Kontrollversuche, die bei entsprechenden Temperaturen im Wasserbad durchgeführt wurden, zeigten gleiche Abnahme des Keimgehalts. Bei der Dauerpasteurisierung, bei der die Milchproben 30 Minuten lang auf 64° C gehalten wurden, war die Keimschädigung sogar größer, nämlich meist 100 %ig.

Der Milchdurchsatz war bei der 1-mm-Düse gering; 500 ccm flossen durchschnittlich binnen 20 Minuten durch. Versuche mit einer 2-mm-

Düse verdoppelten den Milchdurchsatz, zeigten aber nur 40 %ige Abtötung, da die Temperatur nur auf etwa 40° anstieg. Damit dürfte zur Genüge gezeigt sein, daß bei dieser Versuchsanordnung die Erhitzung der Milch als ausreichende Ursache für die Abtötung der Bakterien angesehen werden darf.

Aufrahmung. Die Aufrahmung [1] wurde in 250 ccm Meßzylindern von 3,6 cm lichter Weite bei Zimmertemperatur geprüft. Schon nach kurzer Zeit setzte sich der Rahm ab. Mehrmals am Tage wurde, bei einer Versuchsdauer von 24 Stunden, die Höhe der Rahmschicht abgelesen. Zu den Aufrahmversuchen benutzten wir: Rohmilch eines Milchhofes (Batzenhofmilch), also stets Milch von denselben Kühen, und Sammelmilch, d. h. von verschiedenen Milchhöfen und Gemeinden gemischte Vollmilch.

In beiden Fällen wurde die Aufrahmfähigkeit von roher und von dauerpasteurisierter Milch geprüft, ferner diejenige der mit UKW. behandelten Rohmilch eines Milchhofes und, um einen Vergleich zur Aufrahmung der Handelsmilch zu haben, auch die der hochpasteurisierten Sammelvollmilch. Bei der Dauerpasteurisierung erwärmten wir 250 ccm Milch im Wasserbad von etwa 70° im 300- bis 500-ccm-Erlenmeyerkolben binnen 10 Minuten auf 63° und hielten sie unter dauerndem Schütteln 30 Minuten bei dieser Temperatur.

Tabelle VI. Aufrahmung von Vollmilch nach verschiedener Vorbehandlung.

Datum 1940	Batzenhof, roh	Batzenhof, dauerpasteurisiert	Batzenhof, bestrahlt	Batzenhof, aus dem Standgefäß unter der Rahmschicht	Sammelmilch, roh	Sammelmilch, hochpasteurisiert	Sammelmilch, dauerpasteurisiert
27. VII.	12,5		5	10			
29. VII.	11,5		2	3			
30. VII.	11		10				
30. VII.	8					0	
2. VIII.	10,5		6	5	10,5	2	6
5. VIII.	12		1,5	6,5	11	2,5	5,5
6. VIII.	15,5		5,5	8,5	12	3	5
12. VIII.	9,5	5			8,5	1,5	
5. IX.					12	1	6,5
6. IX.	9	9			12	2	
12. IX.	8,5	6	1,5		11,5	1	
17. IX.	8,5	7,5	6		8	0,5	
25. IX.	8,5	8,5	8	6	8,5	0	
1. X.	9,5	5	7	4	12	0,5	
Mittelwert	10,3	6,9	5,3	6,1	10,6	1,3	5,8

[1] Bekanntlich verändern sich die Eigenschaften der Milch bei jeder Haltbarmachung, am wenigsten bei der Dauerpasteurisierung, bei der Peroxydasen, Albumingerinnung, Labfähigkeit und Aufrahmfähigkeit weitgehend erhalten bleiben. In unseren Versuchen wurde außer der Veränderung des Keimgehalts nur die Aufrahmfähigkeit der Vollmilch als Test herangezogen.

Am besten rahmte die unbehandelte Milch auf, die dauerpasteurisierte Milch schon um 30 bis 50% schlechter. Die hochpasteurisierte Milch hatte nur 1 bis 2% Rahm, die mit UKW. behandelte Milch etwa 5%. Sie kam der dauerpasteurisierten Milch nicht gleich und ergab nur einen Vorteil gegenüber der hochpasteurisierten Milch (Tabelle VI).

Zusammenfassend kann also festgestellt werden, daß ungedämpfte UKW. extrem hoher mittlerer Feldstärken auch bei kurzzeitiger Einwirkung in Medien mit guter Leitfähigkeit ($L = 0{,}005\ \Omega^{-1}\ \mathrm{cm}^{-1}$) bei der vorliegenden Versuchsanordnung eine Erwärmung hervorrufen, die ausreicht, die in der Aufschwemmung enthaltenen Bakterien abzutöten. Dies trifft sowohl für die Aufschwemmung von Reinkulturen als auch von Rohkulturen, wie sie für die Milch gelten, zu. Je größer die Leitfähigkeit, um so größer ist die Erwärmung, um so größer ist die Abtötung (Tabelle VII).

Tabelle VII. Abhängigkeit der Abtötung von der Erwärmung bzw. von der Leitfähigkeit des Mediums.

Aufschwemmungsmedium	Salzzusatz	Leitfähigkeit in $\Omega^{-1}\ \mathrm{cm}^{-1}$	Erwärmung in t °C	Abtötung in %
Abgekochtes, filtriertes Wasser	keiner	0,000 51	31	0
Abgekochtes, filtriertes Leitungswasser	1 g auf 1 Liter	0,001 5	52	41,3
Milch	keiner	0.005 7	62	99.9

Auch der rasche Temperaturanstieg, wie er durch das UKW.-Feld hervorgerufen wird, hat keine stärkere Schädigung der Bakterien zur Folge als die geringere Erwärmungsgeschwindigkeit in den Hocherhitzern der Milchzentrale. Nebenbei sei bemerkt, daß eine Entkeimung der Milch mit UKW., deren Möglichkeit gelegentlich erörtert wurde, gegenüber den heute üblichen Pasteurisierungsverfahren keinerlei Vorteile bietet, zumal die Verbesserung der Aufrahmfähigkeit nur unwesentlich ist, die UKW.-Anlage aber wesentlich teurer sein dürfte und der Milchdurchsatz gering ist.

Wurde bisher also die Auffassung gestützt, daß der Leitungsstrom eine Erwärmung hervorruft, die so hoch sein kann, daß sie letal wirkt, so wird im weiteren dargelegt werden können, daß bei niedrig bleibender Temperatur der Aufschwemmung der Verschiebungsstrom als wesentlicher Faktor für die Abtötung der Bakterien anzusehen ist.

Einwirkung gedämpfter Schwingungen.

1. Versuchsanordnung.

Die gedämpften Schwingungen wurden mit dem gleichen Röhrengerät, dem „Ultra-Pandoros“ der Siemens-Reiniger-Werke, Berlin (Abb. 1),

erzeugt, der mit dem Induktionsstrom eines 20000 Volt Transformators (1)* betrieben wird. Der Transformator (2) transformiert die zur Verfügung stehende Wechselspannung von 125 Volt auf 240 Volt. Der Singer-Unterbrecher (3) zerhackt den Strom im Rhythmus der Wechselstromfrequenz. Die Stromstärke auf der Unterspannungsseite wird mit dem Amperemeter (4)

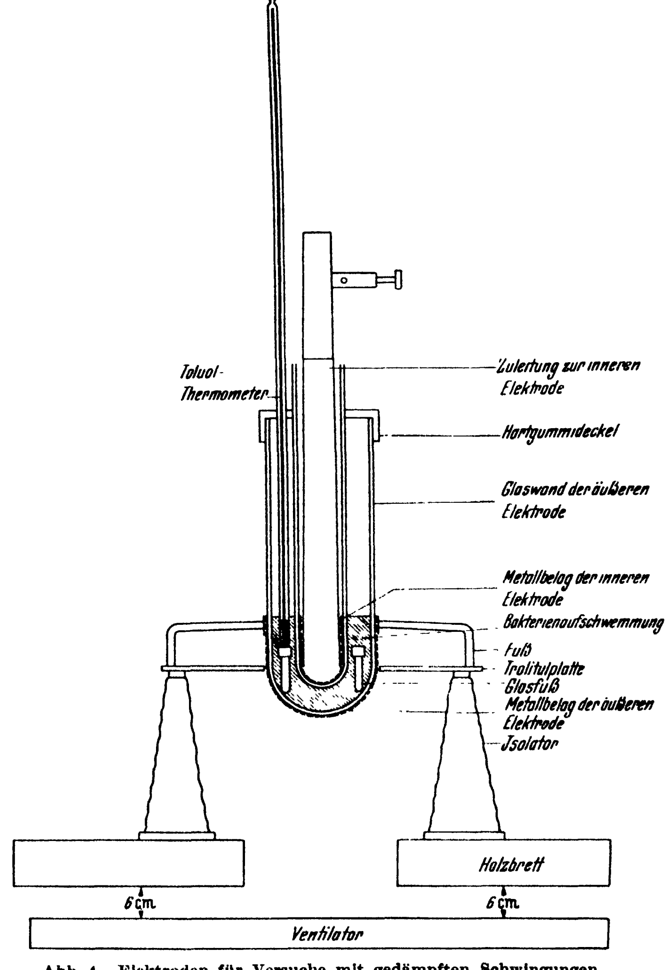


Abb. 4. Elektroden für Versuche mit gedämpften Schwingungen.

kontrolliert, sie beträgt 4,5 Amp. Der hochgespannte Strom wird über ein Glühventil (5), Type V 150/502 p, der Siemens-Reiniger-Werke geleitet. Zur Heizung der Kathode desselben sind zwei Transformatoren (6) und (7) erforderlich. Ein Schiebewiderstand (8) gestattet die genaue Einstellung der erforderlichen Heizstromstärke und das Amperemeter (9) deren Kontrolle. Der durch das Glühventil gleichgerichtete Strom lädt die Hescho-

* Die Ziffern beziehen sich auf Abb. 5.

Kondensatoren (10) (je 5000 pF) auf, bis die Überschlagsspannung der Funkenstrecke (11) erreicht ist. Die Funkenstrecke wird durch einen Ventilator gekühlt. Der Stromstoß nimmt seinen Weg über den Widerstand (12) zu dem Röhrengerät (17). Als Verbraucherkondensator des

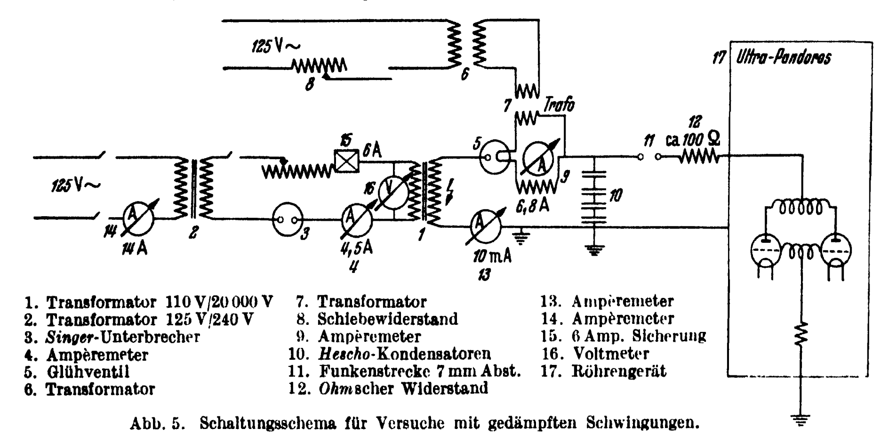


Abb. 5. Schaltungsschema für Versuche mit gedämpften Schwingungen.

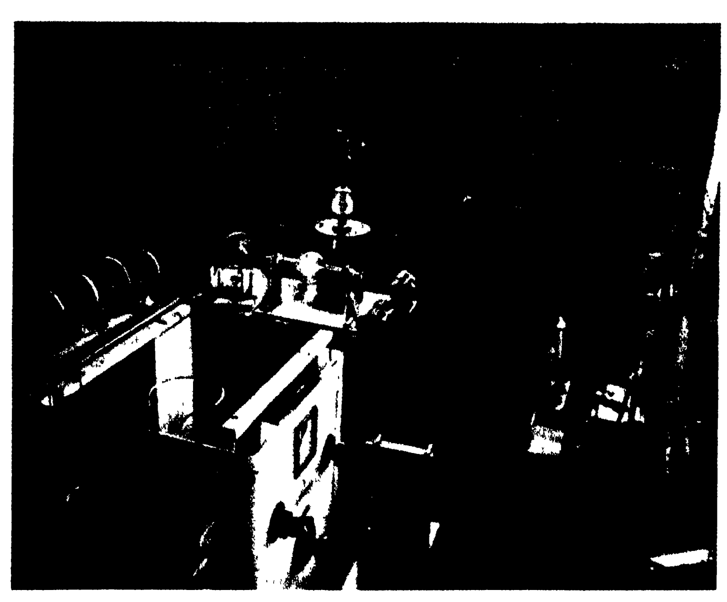


Abb. 6. Versuchsanlage für gedämpfte Schwingungen.
1. Trafo. 2. Glühventil. 3. Funkenstrecke. 4. *Hescho*-Kondensatoren. 5. Ultra Pandoros.

Röhrengerätes war, an Stelle der *Schliephake*-Elektroden, ein Versuchsgefäß angeordnet (Abb. 4). Es bestand aus zwei ineinandergestellten, einseitig geschlossenen Röhren, von denen die innere innen, die äußere außen mit einem Metallbelag versehen war. Um den oberen Rand des äußeren Metallbelags war ein 8 mm breites Messingband gelegt, das mittels einer Schraube

fest angezogen wurde und mit drei Füßen versehen war, von denen auf der Zeichnung, Abb. 4, zwei dargestellt sind. Der eine Zuleitungsdraht wurde mit diesem Messingband verbunden, die leitende Verbindung zur inneren Elektrode durch eine Messingspange erreicht, die dem inneren Metallbelag fest auflag. Die Zuleitungen zur Elektrode bestanden aus 2 mm dicken und 735 mm und 770 mm langen Kupferdrähten (Abb. 7). Die Amperemeter (13) und (14), die 6-Amperesicherung (15) und ein Voltmeter (16) erleichterten die Überwachung der Apparatur (Schaltschema 1, Abb. 5 und 6). Die ganze Anlage stand zur Abschirmung in einem Maschendrahtkäfig. Im Ultra-Pandoros wurden einige Veränderungen vorgenommen. Die Verbindungsleitung zwischen Hochspannungstransformator und Anode sowie der Kondensator in der Gitterableitung wurden entfernt und der Abstand zwischen Gitter- und Schwingkreis-Induktivität vergrößert. Funkenüberschläge zwischen beiden Induktivitäten ließen sich mit Hilfe einer dazwischen gehängten Glasplatte von 10 mm Dicke, 450 mm Länge und 150 mm Breite vermeiden. Eine Messung oder Berechnung der maximalen Feldstärken war bei dieser Versuchsanordnung nicht möglich. Es ist jedoch sehr wahrscheinlich, daß die maximalen Feldstärken niedriger waren als in früheren Versuchen von *Sauter* und *Schwartz* (1939) unter Verwendung eines Funkenstreckensenders.

Die Entkeimung des Versuchsgefäßes (Abb. 4) erfolgte mit ultraviolettem Licht[1]. Das äußere Elektrodengefäß wurde auf ein Becherglas gestellt, das innere waagerecht über ein Becherglas gelegt und nach der halben Sterilisationszeit von 5 Minuten um 180° gedreht. Im UV-Licht wurde das Elektrodengefäß zusammengesetzt, steriles Wasser eingefüllt und der Deckel aufgesetzt. Mit dem eingefüllten, sterilen Wasser wurden zwei Platten mit je $^1/_{10}$ und $^1/_2$ ccm des Wassers ausgegossen, um zu prüfen, ob das Gefäß wirklich steril war.

Der *Singer*-Unterbrecher, ein 20 cm hoher, mit einem Deckel verschließbarer Porzellantopf von 14 cm lichter Weite, dessen Lumen durch eine Porzellanscheidewand in zwei Kammern geteilt ist, wurde mit 5- bis 7,5%iger Schwefelsäure gefüllt, in einen Topf fest eingeklemmt und mit mittelstarkem Wasserstrahl gekühlt.

Eine Impföse Bakterienmaterial wurde in 100 ccm abgekochtem, sterilem Wasser in einer Rollflasche abgespült, die Flasche mit einem Gummistopfen verschlossen und unter fortwährendem Schütteln 10 Minuten in einem Wasserbad von 40° C erwärmt, wobei der Stopfen zweimal kurz gelüftet werden mußte. Die Bakterien werden durch diese Wärmeeinwirkung und nachfolgendes 10 Minuten langes Schütteln mit der Hand weitgehend entballt. Der Keimgehalt der Aufschwemmung lag durchschnittlich bei 10^5 bis 10^6 Keimen im ccm. Von dieser Aufschwemmung wurden 15,5 ccm in das sterilisierte Elektrodengefäß eingefüllt. Die Flüssigkeit stand dann gleich hoch mit den Metallbelägen (Abb. 4). Ein Toluolthermometer wurde mit Alkohol abgewischt, abgeflammt und durch die Bohrung des Hartgummideckels in die Aufschwemmung gebracht. Es stand dabei auf dem

[1] Die verwendeten UV-Strahler, Type Hg NQ 1350/0,43 m, der *Siemens-Schuckert*-Werke hatten eine Gesamtlänge von 43 cm, eine Leuchtlänge von 30 cm und einen Durchmesser von etwa 1,3 cm. Acht Strahler waren so angebracht, daß der Abstand von der Mitte des einen bis zur Mitte des nächsten etwa 4 cm betrug. Die Entfernung von der Glasplatte, auf der die 6,5 cm hohen Bechergläser standen, bis zu den UV-Strahlern betrug 24 cm.

zweifüßigen Glasring auf. Dieser diente dazu, die innere Elektrode in möglichst gleichem Abstand von der äußeren zu halten, um ein annähernd homogenes elektrisches Feld zu erzielen. Das Gefäß wurde in der bereits geschilderten Weise (Abb. 7) an den Patientenkreis angeschlossen. Inzwischen hatte man den Unterbrecher eingeschaltet und das Kühlwasser angestellt. Nachdem die 16-mm-Kugeln in der Funkenstrecke eingesetzt bzw. gedreht und ihr Abstand auf 7,5 mm eingestellt worden war, wurden das Glühventil und die Senderöhren aufgeheizt, dann Vortransformator

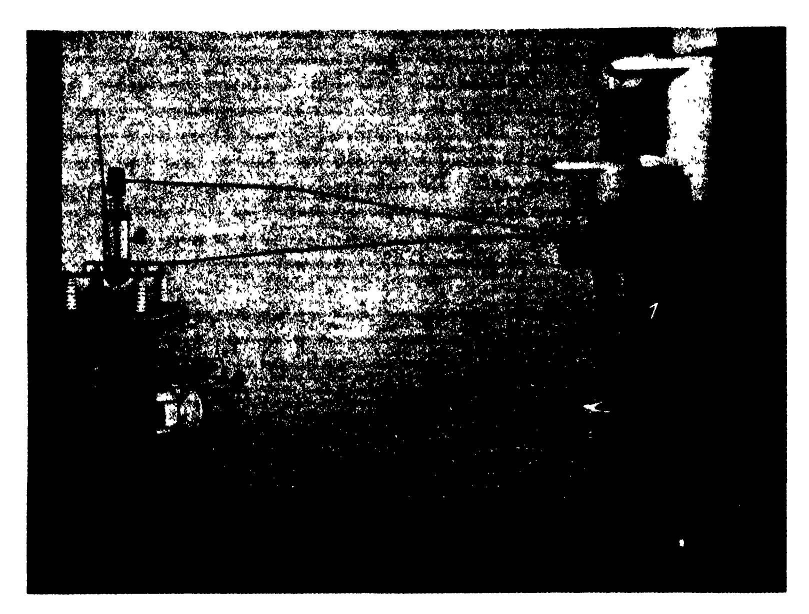


Abb. 7. Anschluß des Versuchskreises für Versuche mit gedämpften Schwingungen.
1. Ultra Pandoros. 2. Versuchselektrode. 3. Ventilator.

und Hochspannungstransformator eingeschaltet. Die Stromstärken und Spannungen, die an den einzelnen Apparaten lagen, sind aus der Schaltskizze 1, Abb. 5, ersichtlich. Die Heizspannung der Senderöhren betrug 20 Volt.

Die Abstimmung erfolgte in der schon im ersten Teil geschilderten Weise mittels eines Kupferdrahtringes von 125 mm Durchmesser und 2 mm Drahtdicke, in den eine 6 Volt/0,04 Amp.-Lampe eingeschaltet war. Die Birne leuchtet im Hochfrequenzfeld auf. Der Kupferdrahtring wurde auf 5 bis 10 cm Entfernung, senkrecht über die Elektrodenzuleitung in unmittelbare Apparatnähe gebracht, wobei die Ebene der Drahtschleife parallel zur Ebene der Elektrodenzuleitung lag. Man drehte an dem Knopf „Abstimmung", bis die Stelle hellsten Aufleuchtens der Birne gefunden war. Auf den übrigen Abschnitten der Skala ging die Birne aus. Gleichzeitig zeigte sich die Verstimmung des Schwingkreises auch daran, daß zwischen den Sicherheitshörnern von Gitter- und Schwingkreisinduktion Funken übersprangen. Beim erstmaligen Abstimmen wurde auch der Knopf „Sperrkreis" betätigt, später war das nicht mehr notwendig. Die Wellenlänge wurde grob mittels des Knopfes „Wellenlänge" eingestellt;

sie wurde indirekt aus der Frequenzmessung in der bereits geschilderten Weise bestimmt.

Die Zahl der Schwingungen je Sekunde wurde mittels eines Stroboskops festgestellt.

Die Besendungszeit betrug 10 Stunden.

Die mittlere Feldstärke war in diesen Versuchen gegenüber derjenigen der Milchversuche wesentlich herabgesetzt. Die Erwärmung war entsprechend geringer. Um 37° C maximal nicht zu überschreiten, wurde beim Erreichen dieser Temperatur die Versuchselektrode mittels eines Ventilators gekühlt, der unterhalb des Holzbrettes in 6 cm Entfernung waagerecht angebracht war und die Luft so durch das ausgesparte Loch im Holzbrett blies, daß die Versuchselektrode von allen Seiten von Zugluft umstrichen wurde (Abb. 4 und 7). Allgemein ging die Temperatur in wenigen Minuten mehrere Grade herunter. Bei etwa 31° wurde der Ventilator wieder abgestellt, um bei 37° wieder in Betrieb gesetzt zu werden, damit die Temperatur auf annähernd 35° C blieb.

Nach zehnstündiger Besendung wurde der Keimgehalt der Aufschwemmung in der üblichen Weise bestimmt. Die gleichen Verdünnungen und Platten wurden von der Kontrollaufschwemmung, die während der Besendungszeit bei Zimmertemperatur gestanden hatte, hergestellt. Der Unterschied im Keimgehalt ergab die Abtötung.

2. *Ergebnisse.*

Eine Reihe von sieben Versuchen zeigte gleichläufige Ergebnisse (Tabelle VIII).

Bei den *Bakterien*-Stämmen schwankte die Abtötung zwischen 21 und 66%. Die *Hefe*-Zellen wurden überhaupt nicht geschädigt, der Keimgehalt stieg, ebenso wie bei den Wärmekontrollen, um 50% an. Die Hefezellen hatten 4,37 bis 5 μ Durchmesser. Bei *Azotobacter* war die 50%ige Abtötung nicht zu werten, da der Wärmeversuch, der bei 32° 10 Stunden im Wärmeschrank stand, ebenfalls eine Keimverminderung um 50% aufwies. Die maximale Versuchstemperatur

Tabelle VIII. Versuche mit verschiedenen Bakterien unter Verwendung gedämpfter Schwingungen.

Stamm	Alter der Kultur	Keimgehalt der Kontrolle bei Zimmertemperatur	Keimgehalt der besendeten Aufschwemmung	Abtötung in %	Maximale Temperatur in t °C
Micrococcus candicans .	5 Tage	$3{,}2 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^7$	66	35
Micrococcus candicans .	7 „	$3{,}5 \cdot 10^7$	$2{,}3 \cdot 10^7$	32	37
b 90°	2 „	$8{,}5 \cdot 10^5$	$6{,}7 \cdot 10^5$	21	35
b 90°	6 „	$4{,}8 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^5$	59	39
Hefe rund	5 „	$3{,}5 \cdot 10^6$	$5{,}2 \cdot 10^6$	0	37
Azotobacter chroococcum	3 „	$2{,}2 \cdot 10^6$	$1{,}1 \cdot 10^6$	50	38,5
b 90°	4 „	$3{,}1 \cdot 10^6$	$1{,}8 \cdot 10^6$	41	37

von 38,5° C war also schon zu hoch gewählt. Die *Azotobacter*-Zellen waren 1,25 bis 1,5 μ breit und 1,85 bis 2 μ lang.

Eine 4 Wochen später angesetzte zweite Reihe von sieben Versuchen (Tabelle IX) brachte dagegen in keinem Fall eine Abtötung, obgleich die Versuche unter den gleichen Bedingungen ausgeführt wurden. Das Alter der Bakterienkulturen dürfte keine Rolle spielen, da in den drei ersten Versuchen genau wie bei der ersten Versuchsreihe, junge Kulturen verwendet wurden. Auch die Erklärung, daß durch lange Kultivierung der Stamm die Empfindlichkeit gegen UKW. verliert, ist unwahrscheinlich.

Tabelle IX. Versuche mit *Micrococcus candicans* unter Verwendung gedämpfter Schwingungen.

Alter der Kultur	Keimgehalt der Kontrolle bei Zimmertemperatur	Keimgehalt der besendeten Aufschwemmung	Abtötung in %	Maximale Temperatur in t °C
4 Tage	$7{,}7 \cdot 10^7$	$8{,}2 \cdot 10^7$	0	36,5
5 „	$1{,}8 \cdot 10^7$	$3{,}2 \cdot 10^7$	0	35
6 „	$1{,}5 \cdot 10^7$	$1{,}6 \cdot 10^7$	0	32
14 „	$5 \cdot 10^7$	$7{,}9 \cdot 10^7$	0	35
24 „	$4{,}1 \cdot 10^5$	$3{,}9 \cdot 10^5$	0	36
25 „	$1{,}9 \cdot 10^5$	$1{,}8 \cdot 10^5$	0	38
27 „	$8{,}5 \cdot 10^4$	$7{,}5 \cdot 10^4$	0	37

Trotzdem wurde anschließend ein Versuch mit dem aus Magermilch am 27. Oktober 1941 isolierten Streptokokkenstamm[1], *Streptococcus lacticus (Kruse)*, der weniger Streptokokken als Lanzettkokken bildet, angesetzt. Der Keimgehalt der Kontrolle: $7{,}2 \cdot 10^7$ ging in der besendeten Aufschwemmung auf $2{,}87 \cdot 10^7$ Keime zurück, d. h. um 60%.

Da nach den bis jetzt besprochenen Versuchen vermutet werden mußte, daß noch unbekannte Faktoren die Keimschädigung maßgeblich beeinflussen, wurde bei den folgenden Versuchen zunächst geprüft, wie weit etwa auch hier die Leitfähigkeit der Aufschwemmung das Ergebnis beeinflußte. Dies wäre denkbar, da das zur Herstellung der Aufschwemmungen und Verdünnungen benutzte Wasser nach dem Abfiltern des ausgeschiedenen Kalkes noch wechselnde Mengen von Ionen enthielt. Außerdem wurden verschiedene Aufschwemmungsmedien verwendet.

[1] Die von *Schliephake* (1935) gemachte Beobachtung, daß Streptokokkenstämme sich durch starke „Mutationserscheinungen" auszeichnen, d. h. sich an einem Tag vollkommen anders verhalten als am nächsten und daher für UKW.-Versuche unbrauchbar sind, konnte bei dem aus Milch isolierten Stamm nicht stärker beobachtet werden als bei anderen auch.

Die Messung der Leitfähigkeit erfolgte mit Hilfe der *Wheatstone*schen Brücke und einer Tauchelektrode (Abb. 8) für geringe Flüssigkeitsmengen. Die Meßgenauigkeit betrug $\pm$ 0,00002 Ω^{-1} cm^{-1}.

Während in früheren Versuchen für jeden Versuch eine neue Kultur genommen wurde, wurden die folgenden Versuchsreihen stets mit einem Kulturröhrchen durchgeführt, um vielleicht vorhandene Unterschiede zwischen den einzelnen Röhrchen in bezug auf Ernährung und Feuchtigkeitsgehalt usw., die indirekt die Anfälligkeit der Bakterien gegen UKW. verändern könnten, auszuschalten.

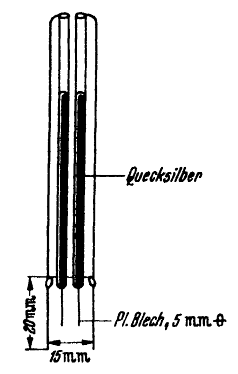


Abb. 8. Bau der Tauchelektrode zur Bestimmung der Leitfähigkeit des Aufschwemm-Mediums.

Die ersten vier Versuche zeigten Keimschädigungen (Tabelle X), die zwischen 34 und 49% schwankten, der 7. Versuch lag mit 27% etwas unterhalb des Durchschnitts. Verwendete man an Stelle von abgekochtem Wasser Leitfähigkeitswasser, dessen Widerstand so groß ist, daß er in der üblichen Weise mit der *Wheatstone*schen Brücke schlecht zu messen ist, so erhielt man keine Keimschädigung (5. und 6. Versuch), desgleichen nicht, wenn man 0,085%ige Kochsalzlösung benutzte (8. Versuch)[1].

Eine Versuchsreihe von zehn Versuchen, wieder von einer Kultur genommen, sollte die zuletzt erhaltenen Ergebnisse bestätigen (Tabelle XI), widersprach jedoch in ihrem Ausfall durchaus den Erwartungen. Von den zehn Versuchen waren nur zwei positiv ausgefallen, einer von ihnen war 24 Stunden lang dem UKW.-Feld ausgesetzt gewesen (Tabelle XI).

Zwei weitere Versuche einer neuen Reihe zeigten, daß eine Wärmevorbehandlung ohne Einfluß auf den Abtötungseffekt ist (Tabelle XII). Im ersten Versuch wurde die Aufschwemmung am Vorabend hergestellt und über Nacht im Brutschrank bei 36° C belassen. Im 2. Versuch stand die Aufschwemmung über Nacht bei Zimmertemperatur, etwa 13°.

Von den letzten drei, wieder mit jungen Kulturen durchgeführten Versuchen fielen zwei negativ aus, der dritte zeigte 17% Abtötung (Tabelle XIII). In diesen Versuchen wurde zusätzlich das p_H der Aufschwemmung am Ende des Versuchs bestimmt, um den Einfluß der

---

[1] Beide Aufschwemmungsmedien werden gut vertragen, wie Kontrollversuche zeigten. Nach *F. W. Tanner* und *Houston* (1940) kann der NaCl-Gehalt bis zu 1% gesteigert werden, erst 1,5- und 2%ige Lösungen hemmen das Wachstum, während nach *Schliephake* und *Haase* (1931) Bakterien in physiologischer Kochsalzlösung absterben. Es wurde in den vorliegenden Versuchen nur eine 0,085%ige Lösung verwendet, um nicht zuviel Elektrolyte in die Lösung zu bekommen.

Tabelle X. Einfluß der Leitfähigkeit auf die Abtötung von *Streptococcus lacticus* (*Kruse*).

Alter der Kultur	Keimgehalt der Kontrolle bei Zimmertemperatur	Keimgehalt der besendeten Aufschwemmung	Abtötung in %	Maximale Temperatur in °C	Leitfähigkeit	Differenz von S und K S > K = –, K > S = +	Aufschwemmungsmedium
10 Tage	$9{,}3 \cdot 10^6$	$5{,}5 \cdot 10^6$	41,9	35	S = 0,000 38 K = 0,000 46	+ 0,000 08	Abgekochtes H_2O
11 „	$1{,}8 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^7$	40	32	S = 0,000 38 K = 0,000 40	+ 0,000 02	Abgekochtes H_2O
18 „	$5{,}8 \cdot 10^6$	$3{,}7 \cdot 10^6$	34	31	S = 0,000 45 K = 0,000 40	– 0,000 05	Abgekochtes H_2O
20 „	$7{,}5 \cdot 10^6$	$3{,}8 \cdot 10^6$	49,1	31	S = 0,000 44 K = 0,000 41	– 0,000 03	Abgekochtes H_2O
24 „	$2{,}5 \cdot 10^6$	$3{,}1 \cdot 10^6$	0	26,8			Leitfähigkeitswasser
25 „	$3{,}4 \cdot 10^6$	$3{,}2 \cdot 10^6$	0	29			Leitfähigkeitswasser
26 „	$4{,}2 \cdot 10^6$	$3 \cdot 10^6$	27,3	30,5	S = 0,000 40 K = 0,000 34	– 0,000 06	Abgekochtes H_2O
27 „	$2{,}2 \cdot 10^6$	$3 \cdot 10^6$	0	34,2	S = 0,001 5 K = 0,001 7	+ 0,000 20	0,085 %ige NaCl-Lösung

S = Leitfähigkeit der mit UKW. behandelten Aufschwemmung. K = Leitfähigkeit der unbehandelten Kontrolle.

H-Ionenkonzentration : prüfen. Das p_H wur mit dem Folienkolo meter nach *Wulff* b stimmt. Das p_H des Wa sers ohne Bakterien, z Beginn des Versuchs b stimmt, lag bei 6,4.

Wenn wir jetzt zu sammenfassend die E gebnisse überblicken, s zeigt sich folgendes: Auc mit der vorliegenden Ap paratur ist trotz des lang sameren Schwingungsein satzes eine Abtötung de Bakterien möglich. Di prozentuale Abtötung er reichte nicht die Höh wie beim Funkenstrecken sender. Allerdings waren mit den bis jetzt behandelten Faktoren keine einheitlichen Ergebnisse zu erzielen. Selbst die Leitfähigkeit reicht zur eindeutigen Erklärung nicht aus. Zwar wurde keine Abtötung bei hoher Leitfähigkeit erhalten, dafür aber wechselnde Ergebnisse bei geringer Leitfähigkeit.

Die absolute Leitfähigkeit lag bei abgekochtem Wasser als Aufschwemmungsmedium zwischen 0,00030 und 0,00049, bei Mischung mit NaCl-Lösung bei 0,00052, bei NaCl-Lösung bei 0,0017 bis 0,0015 und bei Leitfähigkeitswasser bei

Tabelle XI.

Einfluß der Leitfähigkeit auf die Abtötung von *Streptococcus lacticus (Kruse).*

Alter der Kultur	Keimgehalt der Kontrolle bei Zimmertemperatur	Keimgehalt der besendeten Aufschwemmung	Abtötung in %	Maximale Temperatur in °C	Leitfähigkeit	Differenzen von S und K S > K = –, K > S = +	Aufschwemmungsmedium
30 Tage	$6{,}3 \cdot 10^6$	$6{,}6 \cdot 10^6$	0	26	S = 0,000 49 K = 0,000 51	+ 0,000 02	Abgekochtes H_2O
31 „	$8{,}8 \cdot 10^5$	$6{,}0 \cdot 10^5$	32	26	S = 0,000 30 K = 0,000 33	+ 0,000 03	600 ccm Leitungswasser 400 „ Leitfähigkeitswasser
32 „	$7{,}7 \cdot 10^5$	$7{,}6 \cdot 10^5$	0	32,3	S = 0,001 7 K = 0,001 6	– 0,000 1	0,085 %ige NaCl-Lösung
33 „	$5{,}1 \cdot 10^5$	$5{,}0 \cdot 10^5$	0	29	S = 0,000 53 K = 0,000 57	+ 0,000 04	900 ccm abgekochtes Wasser 100 „ 0,085 % NaCl
37 „	$4{,}0 \cdot 10^5$	$3{,}6 \cdot 10^5$	0	28,5	S = 0,000 29 K = 0,000 26	– 0,000 03	600 „ Leitungswasser 400 „ Leitfähigkeitswasser
38 „	$3{,}7 \cdot 10^5$	$3{,}4 \cdot 10^5$	0	28	S = 0,000 27 K = 0,000 30	+ 0,000 03	700 „ Leitungswasser 300 „ Leitfähigkeitswasser
39 „	$6{,}5 \cdot 10^5$	$7{,}4 \cdot 10^5$	0	29	S = 0,000 35 K = 0,000 36	+ 0,000 01	2 mal abgekochtes Wasser
40 „	$1{,}6 \cdot 10^5$	$3{,}3 \cdot 10^5$	0	28,5	S = 0,000 38 K = 0,000 37	– 0,000 01	Abgekochtes Wasser
44 „	$7{,}8 \cdot 10^5$	$4{,}0 \cdot 10^5$	49 *	36	S = 0,000 36 K = 0,000 46	+ 0,000 10	Abgekochtes Wasser
45 „	$3{,}2 \cdot 10^5$	$3{,}2 \cdot 10^5$	0	30	S = 0,000 43 K = 0,000 40	– 0,000 03	Abgekochtes Wasser

* 24 Stunden besendet.

Tabelle X. Einfluß der Leitfähigkeit auf die Abtötung von *Streptococcus lacticus* (*Kruse*).

Alter der Kultur	Keimgehalt der Kontrolle bei Zimmertemperatur	Keimgehalt der besendeten Aufschwemmung	Abtötung in %	Maximale Temperatur in °C	Leitfähigkeit	Differenz von S und K $S > K = -$, $K > S = +$	Aufschwemmungsmedium
10 Tage	$9{,}3 \cdot 10^6$	$5{,}5 \cdot 10^6$	41,9	35	S = 0,000 38 K = 0,000 46	+ 0,000 08	Abgekochtes H_2O
11 „	$1{,}8 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^7$	40	32	S = 0,000 38 K = 0,000 40	+ 0,000 02	Abgekochtes H_2O
18 „	$5{,}8 \cdot 10^6$	$3{,}7 \cdot 10^6$	34	31	S = 0,000 45 K = 0,000 40	− 0,000 05	Abgekochtes H_2O
20 „	$7{,}5 \cdot 10^6$	$3{,}8 \cdot 10^6$	49,1	31	S = 0,000 44 K = 0,000 41	− 0,000 03	Abgekochtes H_2O
24 „	$2{,}5 \cdot 10^6$	$3{,}1 \cdot 10^6$	0	26,8			Leitfähigkeitswasser
25 „	$3{,}4 \cdot 10^6$	$3{,}2 \cdot 10^6$	0	29			Leitfähigkeitswasser
26 „	$4{,}2 \cdot 10^6$	$3 \cdot 10^6$	27,3	30,5	S = 0,000 40 K = 0,000 34	− 0,000 06	Abgekochtes H_2O
27 „	$2{,}2 \cdot 10^6$	$3 \cdot 10^6$	0	34,2	S = 0,001 5 K = 0,001 7	+ 0,000 20	0,085 %ige NaCl-Lösung

S = Leitfähigkeit der mit UKW. behandelten Aufschwemmung. K = Leitfähigkeit der unbehandelten Kontrolle.

H-Ionenkonzentration zu prüfen. Das p_H wurde mit dem Folienkolorimeter nach *Wulff* bestimmt. Das p_H des Wassers ohne Bakterien, zu Beginn des Versuchs bestimmt, lag bei 6,4.

Wenn wir jetzt zusammenfassend die Ergebnisse überblicken, so zeigt sich folgendes: Auch mit der vorliegenden Apparatur ist trotz des langsameren Schwingungseinsatzes eine Abtötung der Bakterien möglich. Die prozentuale Abtötung erreichte nicht die Höhe wie beim Funkenstreckensender. Allerdings waren mit den bis jetzt behandelten Faktoren keine einheitlichen Ergebnisse zu erzielen. Selbst die Leitfähigkeit reicht zur eindeutigen Erklärung nicht aus. Zwar wurde keine Abtötung bei hoher Leitfähigkeit erhalten, dafür aber wechselnde Ergebnisse bei geringer Leitfähigkeit.

Die absolute Leitfähigkeit lag bei abgekochtem Wasser als Aufschwemmungsmedium zwischen 0,00030 und 0,00049, bei Mischung mit NaCl-Lösung bei 0,00052, bei NaCl-Lösung bei 0,0017 bis 0,0015 und bei Leitfähigkeitswasser bei

Tabelle XI.

Einfluß der Leitfähigkeit auf die Abtötung von *Streptococcus lacticus* (*Kruse*).

Alter der Kultur	Keimgehalt der Kontrolle bei Zimmertemperatur	Keimgehalt der besendeten Aufschwemmung	Abtötung in %	Maximale Temperatur in °C	Leitfähigkeit	Differenzen von S und K $S > K = -$, $K > S = +$	Aufschwemmungsmedium
30 Tage	$6{,}3 \cdot 10^6$	$6{,}6 \cdot 10^6$	0	26	S = 0,000 49 K = 0,000 51	+ 0,000 02	Abgekochtes H_2O
31 „	$8{,}8 \cdot 10^5$	$6{,}0 \cdot 10^5$	32	26	S = 0,000 30 K = 0,000 33	+ 0,000 03	600 ccm Leitungswasser 400 „ Leitfähigkeitswasser
32 „	$7{,}7 \cdot 10^5$	$7{,}6 \cdot 10^5$	0	32,3	S = 0,001 7 K = 0,001 6	− 0,000 1	0,085 %ige NaCl-Lösung
33 „	$5{,}1 \cdot 10^5$	$5{,}0 \cdot 10^5$	0	29	S = 0,000 53 K = 0,000 57	+ 0,000 04	900 ccm abgekochtes Wasser 100 „ 0,085 % NaCl
37 „	$4{,}0 \cdot 10^5$	$3{,}6 \cdot 10^5$	0	28,5	S = 0,000 29 K = 0,000 26	− 0,000 03	600 „ Leitungswasser 400 „ Leitfähigkeitswasser
38 „	$3{,}7 \cdot 10^5$	$3{,}4 \cdot 10^5$	0	28	S = 0,000 27 K = 0,000 30	+ 0,000 03	700 „ Leitungswasser 300 „ Leitfähigkeitswasser
39 „	$6{,}5 \cdot 10^5$	$7{,}4 \cdot 10^5$	0	29	S = 0,000 35 K = 0,000 36	+ 0,000 01	2 mal abgekochtes Wasser
40 „	$1{,}6 \cdot 10^5$	$3{,}3 \cdot 10^5$	0	28,5	S = 0,000 38 K = 0,000 37	− 0,000 01	Abgekochtes Wasser
44 „	$7{,}8 \cdot 10^5$	$4{,}0 \cdot 10^5$	49 *	36	S = 0,000 36 K = 0,000 46	+ 0,000 10	Abgekochtes Wasser
45 „	$3{,}2 \cdot 10^5$	$3{,}2 \cdot 10^5$	0	30	S = 0,000 43 K = 0,000 40	− 0,000 03	Abgekochtes Wasser

* 24 Stunden besendet.

Tabelle XII.

Wirkung einer Wärmevorbehandlung auf die Abtötung von *Streptococcus lacticus (Kruse)*.

Alter der Kultur	Keimgehalt der Kontrolle bei Zimmertemperatur	Keimgehalt der besendeten Aufschwemmung	Abtötung in %	Maximale Temperatur in °C	Leitfähigkeit	Aufschwemmungsmedium
29 Tage	$6,2 \cdot 10^5$	$5,8 \cdot 10^5$	13	36,5	S = 0,000 36 K = 0,000 37	Abgekochtes Wasser
35 „	$2 \cdot 10^5$	$3,5 \cdot 10^5$	0	38	S = 0,000 43 K = 0,000 46	Abgekochtes Wasser
40 „	$6,9 \cdot 10^5$	$7,3 \cdot 10^5$	0	42	S = 0,000 43	Abgekochtes Wasser

Tabelle XIII.

Einfluß des p_H auf die Abtötung von *Streptococcus lacticus (Kruse)*.

Alter der Kultur	Keimgehalt der Kontrolle bei Zimmertemperatur	Keimgehalt der besendeten Aufschwemmung	Abtötung in %	Maximale Temperatur in °C	Leitfähigkeit	Aufschwemmungsmedium	p_H
4 Tage	$4,2 \cdot 10^6$	$4,2 \cdot 10^6$	0	39,5	S = 0,000 34	Abgekochtes Wasser	S: etwa 7 K: „ 6
5 „	$4,7 \cdot 10^6$	$4,4 \cdot 10^6$	0	38	S = 0,000 44	Abgekochtes Wasser	S: „ 6,4 K: „ 6,3
6 „	$1,7 \cdot 10^6$	$1,4 \cdot 10^6$	17,7	37,5	S = 0,000 38	Abgekochtes Wasser	S: „ 6,4 K: „ 6,3

etwa 0,00000617. Bei Verwendung von Leitfähigkeitswasser und Kochsalzlösung, den extremen Werten in der Leitfähigkeit, wurde keine Abtötung erzielt. Danach scheinen zu geringe oder zu große Leitfähigkeit die Schädigung der Bakterien zu verhindern. Innerhalb kleiner Intervalle, von 0,00037 bis 0,00049 liegt keine Beeinflussung vor.

Besendete Proben und Kontrollaufschwemmungen zeigen Unterschiede in der Leitfähigkeit, dabei können einmal die S- und einmal die K-Werte höher liegen. In den Tabellen X und XI sind die Differenzen berechnet und mit + bezeichnet, wenn K > S, mit —, wenn S > K ist. Die Ergebnisse scheinen darauf hinzudeuten, daß eine Schädigung der Bakterien mit einer Änderung der Leitfähigkeit, einem Größer- oder Kleinerwerden derselben, parallel läuft. D. h. daß entweder die Leitfähigkeit sich ändert, weil aus den abgetöteten Bakterien Ionen frei werden, das Absterben also der primäre Vorgang ist, oder aber daß die Bakterien infolge der veränderten Leitfähigkeit absterben, die durch das elektrische Feld hervorgerufene Leitfähigkeitsänderung also primär ist. Weitere Versuche in dieser Richtung sollen noch gemacht werden. Eine Gesetzmäßigkeit läßt sich aus diesen Werten bisher nicht ableiten.

Auch die Temperaturverhältnisse reichen zur Erklärung der Ergebnisse nicht aus. In den ersten zwei Versuchen der Tabelle X lagen die maximalen Temperaturen bei 35 und 32° C. In den nächsten Versuchen lief die Kühlung ununterbrochen, der Wärmegrad stellte sich auf 31° ein. In allen Fällen wurde eine Abtötung erhalten, und Kontrollversuche zeigten, daß diese Wärmegrade gut vertragen wurden. Mithin kann die Temperatur der Aufschwemmung die Schädigung nicht hervorgerufen haben.

Wäre allein die Temperatur ausschlaggebend, dann müßte im letzten Versuch dieser Reihe (Tabelle X) bei Verwendung von 0,085 %iger NaCl-Lösung ebenfalls eine Abtötung eingetreten sein, denn hier wurden bei dauernder Kühlung 34° C erreicht. Im zweiten Versuch in Tabelle XI ist eine rund 32 %ige Abtötung zu verzeichnen bei maximal nur 26° C, hier wurde fortlaufend gekühlt. So ließen sich noch viele Beispiele aufzählen. Auch der berechtigte Einwand, daß bei den Kontrollversuchen zwar die gleiche Temperatur erreicht wurde, jedoch ohne Kühlung, läßt sich entkräften. Wohl wird in den S-Versuchen durch die Kühlung ein Teil der Wärme weggenommen, es wird also eigentlich mehr Energie hineingebracht als in die Kontrollen. Aber da in allen Versuchen trotz Kühlung die annähernd gleiche Temperatur erreicht wurde, hätten auch alle Versuche eine Abtötung ergeben müssen, und dies ist nicht der Fall. Man darf daraus wohl schließen, daß in diesen Versuchen die Temperatur die Abtötung höchstens mitbedingt, aber nicht allein dafür verantwortlich zu machen ist. Eindeutiger wäre

die Temperaturfrage zu beantworten, wenn man auf die Kühlung ganz verzichten könnte. Dies ist wiederum bei der vorliegenden Apparatur nicht möglich, weil man dazu mit der Energie zu weit heruntergehen müßte, andererseits aber eine untere Energiegrenze, einen Schwellenwert erreichen muß, um eine Abtötung zu erhalten.

Die Wirkung der UKW. auf biologische Objekte hängt nicht allein von der während der Behandlungsdauer absorbierten Energie ab, sondern auch von der im Behandlungsabschnitt in der Zeiteinheit absorbierten Energiemenge (*Rajewski*, 1938). Nach *Sauter* und *Schwartz* (1939) ist die Bakterienzelle nicht an allen Stellen gleich empfindlich, sondern sie besitzt drei lebenswichtige Zentren[1], von denen mindestens eines die Hochfrequenzleitfähigkeit haben muß, die es befähigt, ein Maximum an Energie zu absorbieren. Erst dann stirbt die Zelle ab. Sehen wir von der Möglichkeit chemischer oder physikalisch-chemischer Umwandlungen in der Zelle ab, so ruft die Energieabsorption auf alle Fälle im Zellinneren eine Erwärmung hervor, die nicht meßbar ist, die sich daher auch auf die Aufschwemmung nicht auswirkt, andererseits aber letal wirken kann. *Groag* und *Tomberg* (1934) sprechen daher von „quasi elektrischen Wirkungen", da diese Art der Erwärmung auf anderem Wege als durch UKW. nicht zu erreichen ist. Wenn daher in der vorliegenden Arbeit zwischen thermischen und spezifischen Wirkungen unterschieden wurde, so heißt das, daß bei thermischer Schädigung das Aufschwemmungsmedium einen für die Bakterien tödlichen Wärmegrad erreichte, bei der spezifischen Wirkung dagegen möglicherweise Wärme innerhalb der Zelle entsteht, ein Wärmeabfall also von innen nach außen stattfindet. Durch die Kühlung (Ventilator) wird die Temperatur der Aufschwemmung herabgesetzt, die Erwärmung innerhalb der Zelle dagegen keineswegs beeinflußt. Die Möglichkeit, daß nur der letzte Faktor die Schädigung bedingt, ist dadurch gegeben. Damit wird die Annahme, daß der Verschiebungsstrom die wirksame Komponente ist, weitgehend gestützt.

Aus den wenigen p_H-Messungen läßt sich über den Einfluß desselben auf die Abtötung nichts aussagen. Dagegen besteht durchaus die Möglichkeit, daß einzelne Stämme verschieden anfällig gegen UKW. sind. Die *Hefe* ist z. B. widerstandsfähiger als die geprüften *Bakterien*-Stämme.

Die von *Sauter* und *Schwartz* (1939) unter anderen Versuchsbedingungen festgestellte Abhängigkeit der Abtötung vom Keimgehalt der Aufschwemmung, wonach der Keimgehalt bei jungen Kulturen

---

[1] Siehe auch die von *Sauter* und *Schwartz* angeführten Arbeiten von *Schubert* (Habil.schrift, Königsberg), *Hercik* (1933), *Mohler* u. *Taylor* (1935) und *Lea*, *Haines* u. *Coulson* (1936).

(36 Stunden) zweckmäßig 10^6 bis 10^8 Keime/ccm, bei alten Kulturen (14 Tage) 10^3 bis 10^4 Keime betragen soll, um annähernd eine 100%ige Abtötung zu erhalten, konnte nicht beobachtet werden. Es wurde einerseits sowohl bei 6 Monate alten Kulturen beim Keimgehalt von 10^4, als auch bei 5 Tage alten Kulturen bei 10^7 Keimen eine Abtötung erhalten, während in anderen Versuchen weder bei 4 Tage alten Kulturen und 10^7 Keimen, noch bei 23 Tage alten Kulturen und 10^4 Keimen eine Abtötung erzielt wurde. Diese Beobachtung wurde sowohl bei *Micrococcus candicans* als auch bei *b 90⁰* und *Streptoccocus* gemacht.

Es bleibt also nur noch die Annahme, daß noch weitere, bis jetzt unbeachtet gebliebene Faktoren mitgewirkt haben können. Derartige Faktoren sind in der Wetterlage zu suchen.

3. *Einfluß der Wetterlage.*

Nach den Feststellungen, die z. B. *Rudder* (1938) und *Bortels* (1942) gemacht haben, wäre vor allem an einen Einfluß des Wetters auf den Zustand der Bakterienzellen und damit auf das Ergebnis der Versuche zu denken. *Bortels* verwendet als Maßstab die Änderung der Hoch- und Tiefdruckgebiete. Er stellte z. B. fest, daß Bakterien bei einem herannahenden Hoch eine gesteigerte Lebenskraft besitzen und dadurch widerstandsfähiger gegen Speichel-Inhibine sind, während sie umgekehrt vor einem Tief leichter und stärker durch die Inhibine gehemmt werden. Er unterscheidet dabei, ob der Versuchsort im zentralen Bereich des Tiefs, im inneren oder äußeren Randgebiet desselben, im indifferenten Randgebiet zwischen Hoch und Tief, im äußeren oder inneren Randgebiet eines Hochs oder im zentralen Bereich eines Hochs liegt. In Analogie zu den Ergebnissen von *Bortels* könnten also die Bakterien auch vor einem Tief leichter durch UKW. geschädigt werden, während sie bei einem herannahenden Hoch widerstandsfähiger sind.

Um diese Möglichkeit zu prüfen, wurden die Versuche zur jeweiligen Wetterlage in Beziehung gesetzt (Tabelle XIV, Abb. 9), außerdem für die gleichen Versuche Stromstärke und Spannung des Niederspannungsstromes sowie die Hochspannungsstromstärke eingetragen, um einen Anhalt für die Leistung zu gewinnen. Als Maßstab der Wetteränderung diente zunächst der örtliche Luftdruck, gemessen in mm Hg, wobei das Wetter jeweils schon mindestens 2 Tage vor und nach dem Versuchstag mitberücksichtigt werden muß, damit man den Verlauf der Änderung besser verfolgen kann. Der Vergleich der Wetterkarte mit dem Ergebnis der einzelnen Versuche läßt erkennen, daß ein Zusammenhang beider mindestens recht wahrscheinlich ist. Die Lebensfähigkeit der Bakterien wird durch ansteigenden Luftdruck so gesteigert, daß sie der UKW.-Wirkung besser standhalten können. Die Versuche 6, 7, 9, 10, 13, 14

Tabelle XIV. Übersicht über Versuche mit *Streptococcus lacticus* unter Berücksichtigung der aufgewandten Leistung.

Lfd. Nr.	Milliamp. Hochspannung	Volt Unterspannungsseite des Trafos	Produkt Milliamp. × Volt	Aufschwemmungsmedium	Abtötung in %
1	7	100—110	735		60
2	10	85— 90	850		41,9
3	8—10	85—110	810	Abgekochtes H_2O	40
4	7—10	110	850		34
5	8—10	90	810		49
6	7—10	100—105	900	Leitfähigkeitswasser	0
7	7— 8	100	750	Leitfähigkeitswasser	0
8	7	90	630	Abgekochtes H_2O	27
9	8— 9	100	850	0,085 %ige NaCl-Lösung	0
10	- -	95		Abgekochtes H_2O	0
11	6—12	80—105	810	600 ccm H_2O 400 „ Leitfähigkeitswasser	32
12	9—10	95—100	950	0,085 %ige NaCl-Lösung	0
13	9—10	95—100	950	900 ccm H_2O 100 „ 0,085 %ige NaCl-Lösung	0
14	—	105		600 ccm H_2O 400 „ Leitfähigkeitswasser	0
15	8— 9	100	850	700 ccm H_2O 300 „ Leitfähigkeitswasser	0
16	7— 9	90—100	760		0
17	7— 8	100	750		0
18	8—12	100	900		48
19	6— 7	100	650		0
20	7	110	770	Abgekochtes H_2O	13
21	7— 9	110	880		0
22	5— 6	110	600		0
23	5— 6	110	600		0
24	6	105—110	630		0
25	5	110	550		17,7

15, 21, 22 und 24 zeigen dies eindeutig. Ebenso klar liegen unter entgegengesetzten Bedingungen die Verhältnisse bei den Versuchen 1, 2, 3, 4, 8, 11, 18 und 20. Hier sind die Bakterien durch das vordringende Tief geschwächt, so daß sie durch die UKW.-Einwirkung abgetötet werden.

Bei Versuchen 9 und 12 wurde an Stelle von abgekochtem Wasser 0,085 %ige NaCl-Lösung zur Aufschwemmung verwendet. Obwohl die angewandte Energie besonders in Versuch 12 über dem Durchschnitt lag, fand trotz eines herannahenden Tiefs keine Abtötung statt. Diese Feststellung bestätigt die Vermutung, daß bei Verwendung einer 0,085 %igen NaCl-Lösung keine Abtötung erfolgt, weil das Verhältnis von Verschiebungsstrom zu galvanischem Strom zugunsten des galvanischen Stromes verschoben wird, im Zellinneren infolgedessen keine maximale Absorption stattfindet.

Die Versuche 14 und 15 sind mit Leitfähigkeitswasser durchgeführt worden und ergaben beide keine Abtötung. Das Ergebnis ist um so

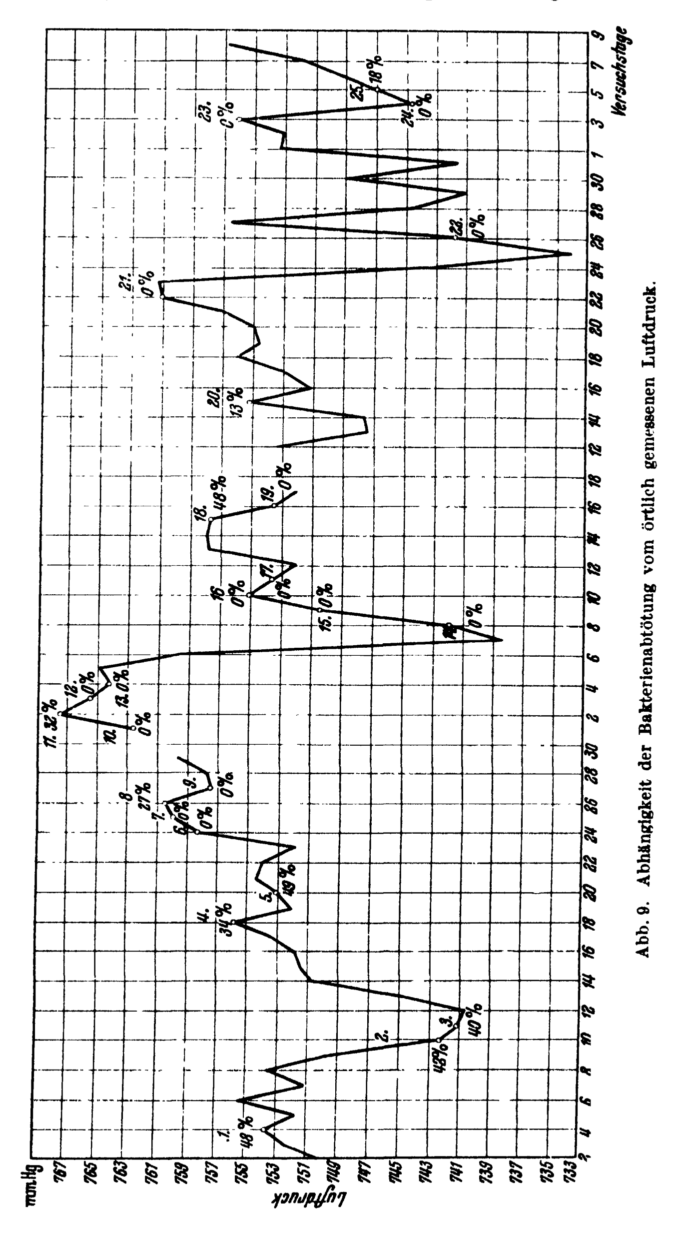


Abb. 9. Abhängigkeit der Bakterienabtötung vom örtlich gemessenen Luftdruck.

unerklärlicher, als gerade hierbei das Verhältnis von Leitungs- zu Verschiebungsstrom weitgehend zugunsten des letzten verschoben ist

Beide Versuche sind aber bei herannahendem Hoch durchgeführt worden, so daß bei Berücksichtigung der Wetterlage eine Abtötung nicht erwartet werden konnte. In der Zwischenzeit durchgeführte Versuche haben gezeigt, daß unter günstigen „Wetterbedingungen" eine Abtötung eintritt.

Die Versuche 16 und 23 lassen sich vielleicht damit erklären, daß der vorhergehende Druckanstieg sehr steil war, die Bakterien dadurch möglicherweise besonders gestärkt wurden, so daß eine Abtötung trotz des herannahenden Tiefs ausblieb.

Bei Versuch 19 wurde auf einem absteigenden Ast der Kurve keine Abtötung erhalten, obwohl die Bakterien geschwächt sein müßten. Die angewendete Energie war ziemlich klein, so daß möglicherweise der Ausfall darauf zurückgeführt werden kann (vgl. Tabelle XIV). Unverständlich in bezug auf Veränderungen des örtlichen Luftdrucks allein bleiben vorerst die Ergebnisse der Versuche 17 (keine Abtötung bei absteigender Kurve), 5 und 25 (Abtötung am aufsteigenden Ast der Wetterkurve), wobei noch besonders zu beachten ist, daß die in Versuch 25 zugeführte Energie die kleinste aller Versuche war. Setzt man jedoch an Stelle des örtlich gemessenen Luftdrucks die Großwetterlage und beachtet die Tendenz der Hoch- und Tiefdruckgebiete, sich gegeneinander zu verlagern, abzuschwächen oder aufzufüllen, so zeigt sich, daß die Versuche 5 und 25 sowie die unbefriedigend gedeuteten Versuche 16 und 19 erfaßt werden können. Während die Wetterkurve der örtlich gemessenen Luftdrucke für die Versuche 16 und 19 einen Übergang vom Hoch zum Tief vermuten läßt, zeigt die Großwetterlage, daß sich Karlsruhe am Versuchstag des 16. Versuchs im äußeren Randgebiet eines Hochs befand. Bis zum nächsten Tag näherte sich das Hoch wenig, während ein Tief herankam und Karlsruhe damit in die indifferente Zone zwischen einem Hoch und Tief zu liegen kam.

Bei Versuch 19 zeigt die Gesamtwetterlage einen Übergang vom indifferenten Gebiet in das äußere Randgebiet eines Hochs, während der örtliche Luftdruck fallende Tendenz aufweist. In beiden Fällen konnte also eine Abtötung nicht erwartet werden.

Gerade umgekehrt liegen die Verhältnisse für die Versuche 5 und 25. Hier ist ein klarer Übergang vom äußeren Randgebiet eines Hochs zum äußeren Randgebiet eines Tiefs in Versuch 5, und ein Übergang von der indifferenten Zone zum äußeren Randgebiet eines Tiefs in Versuch 25 zu erkennen, weshalb also eine Abtötung eintreten mußte. Der örtliche Luftdruck stieg dabei in beiden Fällen an.

Die Ergebnisse der Versuche 17 und 23 lassen sich weiterhin nicht erklären.

Es dürfte also mit ziemlicher Sicherheit erwiesen sein, daß tatsächlich ein Zusammenhang zwischen Wetterlage und Anfälligkeit der Bakterien

besteht. Allerdings zeigt sich bei den positiven Versuchen immer noch eine erhebliche Schwankung im Ausmaß der Abtötung zwischen 20 und 60 %, ferner bleibt ein unerklärlicher Rest von 10 % der Gesamtzahl der Versuche zurück. Bei Verwendung des Funkenstreckensenders (*Sauter* und *Schwarz*, 1939) kam ein Wetterfaktor überhaupt nicht zur Beobachtung, weil wahrscheinlich höhere maximale Feldstärken auftraten, die selbst bei ungünstiger Wetterlage zur Abtötung der Bakterien ausreichten. Eine weitere Bearbeitung dieser Fragen ist also erforderlich.

Über die Natur des wirksamen Faktors kann vorerst nichts ausgesagt werden. Die Kennzeichnung der allgemeinen Wetterlage oder die Angabe des örtlichen Luftdrucks dienen nur als vorläufiger Anhaltspunkt zur Darstellung der Zusammenhänge. Es wäre sogar denkbar, daß nicht einmal das Wetter unmittelbar, sondern ein sowohl die Wetterentwicklung wie die Anfälligkeit der Bakterien beeinflussender Faktor das eigentlich wirksame ist.

Zusammenfassung.

Versuche mit ungedämpften Schwingungen.

1. Ungedämpfte Ultrakurzwellen ($\lambda = 5{,}5$ m) hoher mittlerer Feldstärken rufen in Medien guter Leitfähigkeit ($L = 0{,}005\ \Omega^{-1}\ cm^{-1}$) eine Erwärmung hervor. Die Erwärmung kann so hoch werden, daß die in der Aufschwemmung enthaltenen Bakterien absterben.

2. Der Prozentsatz der abgestorbenen Zellen ist abhängig von der Temperaturerhöhung, die ihrerseits wieder von der Leitfähigkeit der Aufschwemmung abhängt; je größer die Leitfähigkeit, um so höher die Erwärmung, um so stärker die Abtötung.

3. Der in der Aufschwemmung fließende Leitungsstrom ruft also die Temperaturerhöhung hervor, die letal wirken kann.

4. Die Ergebnisse wurden sowohl mit wässerigen Bakterienaufschwemmungen wie mit Mager- und Vollmilch erzielt. Bei entsprechenden Versuchsbedingungen wurden die Keime zu über 90 % abgetötet.

5. Die Aufrahmung der UKW.-behandelten Milch wird herabgesetzt, sie ist jedoch besser als die der hochpasteurisierten Vollmilch.

6. Eine Entkeimung der Milch mittels hochfrequenter Wechselfelder dürfte gegenüber den zur Zeit üblichen Pasteurisierungsverfahren keinen Vorteil bieten.

Versuche mit gedämpften Schwingungen.

1. Unter Einhaltung bestimmter Bedingungen ist es möglich, mit einem Ultrakurzwellen-Gerät in Gegentaktschaltung, das mittels eines Hochspannungstransformators und einer Funkenstrecke stoßweise be-

trieben wird, Bakterien bei Temperaturen unterhalb 40° C und bei einer zehnstündigen Einwirkung des UKW.-Feldes abzutöten.

2. Die Abtötung wird nicht, oder jedenfalls nicht allein, durch die Temperatur der Aufschwemmung erzielt.

3. Selbst bei gleichbleibenden Bedingungen sind etwa 50 % der Versuchsergebnisse widerspruchsvoll. Die Ursache kann darin liegen, daß bis jetzt noch nicht kontrollierte Faktoren unter den gegebenen Versuchsbedingungen das Resultat mitbestimmen.

4. Die Wetterlage, deren Einfluß auf mikrobiologische Vorgänge aus Versuchen von *Bortels* und anderen bekannt geworden ist, erwies sich auch im vorliegenden Fall als wesentlicher, die Ergebnisse beeinflussender Faktor, wobei nicht nur der örtlich gemessene Luftdruck, sondern die Gesamtwetterlage als Maßstab herangezogen werden muß.

5. Die Bakterien werden bei einem herannahenden Tief geschädigt, während sie bei einem herannahenden Hoch die UKW.-Behandlung, die jeweils unter den gleichen Bedingungen durchgeführt wurde, vertragen.

6. Ob tatsächlich die Druckverhältnisse oder eine andere Komponente des Wetters die entscheidende Rolle spielen, muß dahingestellt bleiben. Es wäre sogar denkbar, daß es sich um einen Faktor *X* handelt, der sowohl die „Wetterlage" wie die Bakterien beeinflußt und so eine direkte Abhängigkeit der Bakterien vom Wetter vortäuscht. Die „Wetterlage" kann also zunächst nur als Kriterium angesehen werden.

7. Die Leitfähigkeit des Aufschwemmungsmediums ist anscheinend auch unter Berücksichtigung der Wetterlage von Einfluß auf die Abtötung.

8. Selbst unter Berücksichtigung der „Gesamtwetterlage" bleibt der Ausfall von etwa 10 % der Versuche vorerst noch unerklärlich, so daß die Beteiligung weiterer Faktoren, die übrigens auch in den schwer zu überblickenden physikalischen Versuchsbedingungen liegen können, nicht ausgeschlossen ist.

9. Sämtliche bisher geprüften Bakterienarten — *b 90°* aus Erde, *Micrococcus candicans*, *Streptococcus lacticus (Kruse)* — erwiesen sich als anfällig gegen Ultrakurzwellen, jedoch scheint der Grad der Empfindlichkeit verschieden zu sein. Es gelang bisher nicht, *Hefe* abzutöten.

Literatur.

Arbeiten a. d. preuß. Versuchs- u. Forschungsanstalt f. Milchwirtschaft in Kiel: Prüfung an Hoch- und Momenterhitzern. Berlin SW 48, Verlag d. milchwirtsch. Zeitung, 1931 u. 1932. — *Bortels, H.*, Centralbl. f. Bakt. II, **104**, 189, 1942. — *Gale, M. D.*, u. *D. Miller*, New York. N. Y. J. of Lab. a. Clin. Med. **21**, 31, 1936. — *Grasser, H.*, Med. Klin. **32**, 706, 1936. — *Groag, P.*, u. *V. Tomberg*, Wien. klin. Wochenschr. **47**, 267, 1934. — *Haase, W.*,

u. *E. Schliephake*, Strahlentherapie **40**, 133, 1931. — *Hausser, I.*, Sitzungsber. d. Heidelberger Akad. d. Wissensch. 1939, 4. Abhandlung. — *Hercik, F.*, Strahlentherapie **47**, 374, 1933. — *Lea, D. E.*, *R. B. Haines* u. *C. A. Coulson*, Proc. Roy. Soc. London (B) **120**, 47, 1936. — *Lehmann* u. *Neumann*, Atlas und Grundriß der Bakteriologie. München, Lehmanns Verlag, 1912. — *Lentze, F.*, Centralbl. f. Bakt. I, **126**, 508, 1932. — *Liebesny, P.*, *L. Wertheim* u. *Scholz*, Klin. Wochenschr. **12**, Nr. 4, 1933. — *Liebesny, P.*, Wien. klin. Wochenschr. **47**, 55, 1934. — *Derselbe*, Strahlentherapie **56**, 109, 1936. — *Mohler, F. L.*, u. *L. S. Taylor*, Amer. J. Röntgenol. a. Radium Therap. **34**, (1), 89, 1935. — *Oettingen, K. v.*, Strahlentherapie **41**, 251, 1931. — *Ostertag, B.*, Deutsch. med. Wochenschr. **58**, 1240, 1932. — *Paulian, M. D.*, u. *J. Bistriseano*, Bullet. de l'Academie de Médicine **116**, 883, 1936. — *Rajewski, B.*, Ergebn. d. biophysikalischen Forschg. **1**, 52, 1938. — *Reiter, P.*, Zeitschr. f. Neurologie u. Psychiatrie **156**, 382, 1936, I., II., III. — *Rudder, B. de*, Grundriß einer Meteorobiologie des Menschen. Berlin, Springer, 1938. — *Sauter, E.*, u. *W. Schwartz*, diese Zeitschr. **10**, 189, 1939. — *Schliephake, E.*, Kurzwellentherapie, 2. Aufl. 1935. Verlag G. Fischer, Jena. — *Derselbe*, Münch. med. Wochenschr. 1941, S. 626. — *Steinhäuser, A.* Strahlentherapie **68**, 79—89, 1941. — *Tanner, F. W.*, u. *C. W. Houston*, Centralbl. f. Bakt. II, **102**, 353, 1940. — *Tomberg, V.*, Strahlentherapie **59**, 373, 1937. — *Weiß, H.*, *J. Piele*, *V. Tomberg*, Klin. Wochenschr. **16**, 750, 1937.

Eine russische Arbeit von *K. F. Firsowa*: Zur Frage der bakteriziden Wirkung von ultrakurzen Wellen auf Mikroben, Akad. d. R. A. 14, Leningrad 1940, konnte nicht berücksichtigt werden.

(Aus dem Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen.)

Weitere Untersuchungen über den Abbau der Cellulose durch Bacillus cellulosae-dissolvens Khouvine.

Von

Rudolf Meyer.

Mit 15 Textabbildungen.

(Eingegangen am 10. April 1943.)

Zur Reinzüchtung des zuerst von *Omelianski* ausführlich beschriebenen Erregers der Cellulosegärung (anoxydativen[1] nach *Bernhauer*) eignet sich bisher immer noch am besten das von *Khouvine* (1) eingeführte Waschverfahren, mit dessen Hilfe ihr erstmalig die Reinzüchtung dieses Bakteriums gelang. Dem Waschverfahren haften zwar noch Bedenken an, und es wurden daher mehrfach Versuche unternommen, das Reinzuchtverfahren auch dieses Bakteriums nach dem *Koch*schen Plattengußverfahren durchzuführen; aber die besonderen Eigentümlichkeiten dieses Organismus und die Beschaffenheit der Kulturmedien gestatten keine strenge Einhaltung der Grundsätze, auf denen das *Koch*sche Verfahren beruht, so daß diese Versuche bisher unbefriedigend bleiben mußten.

Nach dem *Khouvine*schen Verfahren gelangt man zu einem Organismus, der im wesentlichen dem von *Omelianski* und den meisten späteren Forschern beschriebenen entspricht. Vom Verfasser wurde festgestellt, daß zu Beginn der Entwicklung, bevor die Gärung einsetzt, in der Kultur eine lebhaft bewegliche *Spindelform* dieses später stäbchen-, bei der Sporenbildung trommelschlegelförmigen Bakteriums vorwiegt, auf die wahrscheinlich der vor Beginn der Gärung zu beobachtende Sauerstoffverbrauch der Kultur zurückzuführen ist[1]. Erst aus dieser Form entwickelt sich dann später, mit einsetzender Gärung, nachdem sich die Spindeln der Cellulosefaser angelegt haben, die Stäbchenform, die den eigentlichen Abbau der Cellulosefaser durchführt. Neben diesen genannten Formen wurden aber auch von verschiedenen Autoren faden- und zitronenförmige Entartungen dieses Organismus und alle Übergänge zwischen diesen und den „normalen" Formen aufgefunden, so daß der Zusammenhang zwischen allen diesen Formen außer Zweifel steht[2].

Hinsichtlich des Stoffwechsels kann festgestellt werden, daß beim Abbau der Cellulosefaser in der künstlichen Kultur an gasförmigen Bestandteilen in erster Linie Kohlendioxyd auftritt; es ist aber wahrscheinlich, daß dieses nur zum Teil unmittelbar beim Abbau der Cellulosefaser entsteht, und daß ein Teil

[1]) Vgl. jedoch S. 265 und *R. Meyer* (3). — [2]) Von *V. Meyer* wird allerdings ein solcher Zusammenhang bestritten.

desselben erst durch die ebenfalls als Stoffwechselprodukte auftretenden organischen Säuren aus dem zur Neutralisation der Nährlösung zugesetzten Calciumcarbonat freigemacht wird. Neben dem Kohlendioxyd beobachtet man an gasförmigen Bestandteilen in weit geringerer Menge, und auch nicht immer, Wasserstoff. Das von *Omelianski* beobachtete Methan ist aller Wahrscheinlichkeit nach auf die Tätigkeit von verunreinigenden Begleitorganismen zurückzuführen, die in seinen Kulturen noch vorhanden waren. Spätere Autoren haben dieses Gas höchstens in so geringer Menge gefunden, daß sie innerhalb der Analysenfehler liegen. Ebenso wird es sich mit dem Schwefelwasserstoff verhalten, den man ziemlich regelmäßig in den Cellulosezersetzerkulturen beobachten kann. An nicht gasförmigen Stoffwechselprodukten tritt neben den organischen Säuren auch Äthylalkohol auf.

Fehlerquellen bei der Reinzüchtung des Cellulosezersetzers.

Weiterhin glaubten der Verfasser [*R. Meyer* (3)] und dann auch *Khouvine-Soeters*, *Pochon* (1) und *Imšenecki* (6) festgestellt zu haben, daß der Cellulosevergärer — gegebenenfalls nach Gewöhnung — auch in zellulosefreien Medien (Bouillon, Glucose-Nährlösung) gedeihen kann. Es gelang Verfasser sogar, nach vielen Bouillonpassagen den Cellulosezersetzer wieder in der reinen Cellulose-Mineral-Nährlösung[1] zum Anwachsen zu bringen. Die ersten Bedenken entstanden jedoch, als es selbst in mehr als 100 Versuchen nicht gelingen wollte, Einzellkulturen des Cellulosezersetzers in Bouillon oder auf Bouillon-Agar zum Anwachsen zu bringen, weder bei Übertragung von Sporen noch bei Übertragung von vegetativen Stäbchen. Auch beim Eintragen einzelner von Stäbchen besetzter Cellulosefasern in Bouillon erfolgte in den meisten Fällen kein Wachstum; wenn ein solches jedoch eintrat, dann handelte es sich nicht um Cellulosezersetzer[2]. Die Bedenken des Verfassers wurden jedoch verstärkt, als bei den Weiterimpfungen Unregelmäßigkeiten bei der Farbstoffbildung beobachtet wurden. Jedoch war zunächst nicht einzusehen, woher die Verunreinigungen in den Kulturen stammen sollten. Gelegentliche unbeimpfte Kontrollen mit Cellulose-Mineral-Nährlösung hatten zu Bedenken keinen Anlaß gegeben; und bei Zimmertemperatur konnte diese Nährlösung im sterilisierten Zustande länger als ein Jahr unverändert aufbewahrt werden.

Um aber Gewißheit über die Berechtigung der erwähnten Bedenken zu erhalten, wurden nochmals zunächst zwei unbeimpfte Kontrollen der in üblicher Weise sterilisierten Cellulose-Mineral-Nährlösung (Dampftopf fraktioniert, bei anderen Versuchen auch Autoklav $^1/_2$ Stunde

[1] Verfasser benutzte anfangs eine solche folgender Zusammensetzung: Dest. Wasser 1000 ccm, K_2HPO_4 puriss. *Merck* 1,0 g, $(NH_4)_2HPO_4$ p. A. *Merck* 1,0 g, $MgCl_2$ p. A. *Merck* 0,5 g, Kreide 12,0 g, Filtrierpapier 8,0 g. Vgl. auch *R. Meyer* (1) u. (3). Abänderungen siehe weiter unten. — [2] Zuerst glaubte Verfasser, daß diese Verunreinigungen aus dem Abschlußwasser auf dem Hohlschliff stammten.

bei 130° C) einige Zeit bei 37° C im Brutschrank aufgestellt. Bereits nach 14 Tagen stellte sich das überraschende Ergebnis heraus, daß sich in einer dieser Kulturen nicht nur gewöhnliche sporenbildende Stäbchen, sondern auch ein *Cellulosezersetzer* entwickelt hatten. Eine Wiederholung dieses Versuchs mit 5 Kontrollen ergab das gleiche. Es entstand nun die Frage, mit welchem der Bestandteile der Cellulose-Mineral-Nährlösung die Verunreinigung eingeführt worden war, die sogar die Sterilisationsmaßnahmen überstanden hatte. Die löslichen Bestandteile schieden ohne weiteres aus. Der Verdacht konnte sich also auf das Calciumcarbonat, das als Kreide, und die Cellulose, die als Filtrierpapier gegeben waren, beschränken.

Zur Klärung dieser Verhältnisse wurde folgender Versuch angesetzt: 9 Gärkolben mit je 250 ccm Inhalt wurden mit Cellulose-Mineral-Nährlösung beschickt; jedoch wurde in 5 von ihnen das Calciumcarbonat nicht gleich hinzugesetzt, sondern zunächst getrennt in 100 ccm Jenaer Erlenmeyerkolben in etwas Nährlösung ohne die Cellulose getan. Die Gärkolben wurden zweimal bei 130° C autoklaviert mit einer Zwischenzeit von zwei Tagen, während welcher sie im Brutraum bei 37° C aufgestellt waren; kurz vor dem zweiten Autoklavieren wurden sie bis 12 mm Hg evakuiert, um etwa okkludierte Luft zu entfernen. Die Erlenmeyerkolben mit der Kreide wurden im Dampftopf sterilisiert. Die restlichen Gärkolben und Erlenmeyerkolben wurden gerade so behandelt, nur waren hierbei die Rollen von Kreide und Cellulose vertauscht. Nach der Sterilisation wurde die Kreide bzw. Cellulose aus den Erlenmeyerkolben unter Beachtung der Sterilerhaltung den Gärkolben einverleibt. Sämtliche Gefäße wurden unbeimpft im Brutraum bei 37° C aufgestellt.

Bereits nach vier Tagen hatten sämtliche 9 Gärgefäße Unterdruck hergestellt[1]. Nach 22 Tagen zeigten vier von den fünf Gefäßen mit autoklaviertem Kalk Andeutung von Cellulosezersetzung (Welken der Cellulosestreifen, bei einigen beginnende Farbstoffbildung), wenn auch in verschiedenem Maße. Dagegen war bei den Gefäßen mit autoklavierter Cellulose noch kaum eine Andeutung eines Celluloseabbaues festzustellen. Diese wurde hier erst nach 40 Tagen bemerkbar und blieb während der ganzen Versuchsdauer von 104 Tagen hinter der der ersten 5 Gärgefäße zurück. Nach diesem Ergebnis möchte man geneigt sein, die Verunreinigung in der Cellulose zu vermuten. Dem ist aber nicht so, wie der folgende Versuch zeigt.

Zugleich mit dem eben genannten Versuch wurde noch ein weiterer angesetzt, bei dem die gleiche Cellulose verwendet wurde, wie in dem obigen, bei dem jedoch die Kreide ersetzt wurde durch das *Merck*sche Präparat „Calcium carbonicum präcipitatum p. A.“[2]. Die fünf für diesen Versuch verwendeten Gärgefäße wurden nur im *Koch*schen Dampftopf fraktioniert (dreimal) sterilisiert mit eintägiger Unterbrechung, während welcher die Gefäße bei 37° C im Brutraum aufgestellt wurden.

---

[1] Vgl. *R. Meyer* (3). — [2] Dieses benutzte Verfasser früher nur für gasstoffwechselanalytische Versuche.

Während der ganzen Versuchsdauer von 104 Tagen wurde in diesen Gefäßen weder die Entstehung eines Unterdruckes noch die geringste Veränderung an der Cellulose beobachtet. Auch mikroskopisch war keinerlei Veränderung an der Cellulose noch die Anwesenheit irgendwelcher Bakterien festzustellen. Die verunreinigenden Keime können sich demnach nur in der *Kreide* befunden haben[1]. Und nach dem ersten Versuch sieht es merkwürdigerweise fast so aus, als ob das Autoklavieren der Kreide das Wachstum der darin enthaltenen Keime noch gefördert hätte. Das Verhalten dieser aus der Kreide stammenden Keime war allerdings in den verschiedenen Gefäßen recht verschieden; manche daraus entstandenen Kulturen zeigten Farbstoffbildung, bei anderen verwelkten die Cellulosestreifen ohne Farbstoffbildung.

Die Versuche haben also gezeigt, daß zur Sterilisation von Nährlösungen, die technisches Calciumcarbonat enthalten, die bisher verwendeten Sterilisationsverfahren nicht ausreichen. Für die Cellulose-Mineral-Nährlösung ist daher die Verwendung reinsten gefällten Calciumcarbonates unerläßlich; aber auch dann empfiehlt sich noch die Anwendung sorgfältigster Sterilisationsmaßnahmen.

Die Mitteilung dieser an sich negativen Ergebnisse hätte sich erübrigt, wenn sie nicht für spätere Versuche mit dem Cellulosevergärer einige Bedeutung hätten und eine Überprüfung aller bisher mit dem Cellulosevergärer ausgeführten Versuche erforderlich machten. Denn es muß nun natürlich nachgeprüft werden, wieweit bei diesen Versuchen den nach dem oben Gesagten zu stellenden Forderungen entsprochen wurde. Zwar werden die (spärlichen) cytologischen Ergebnisse früherer Untersuchungen hierdurch kaum berührt; denn in den untersuchten Kulturen sind natürlich Cellulosezersetzer überhaupt vorhanden gewesen, wenn sie in den fortlaufenden Überimpfungen auch nicht notwendig voneinander abstammen mußten. Ebenso werden die morphologischen Ergebnisse der früheren Untersuchungen kaum korrigiert zu werden brauchen; es wäre wohl denkbar, daß eine Form, die einer Verunreinigung zugehört, dem Cellulosezersetzer zugeschrieben wurde; aber die meisten Autoren haben nur die Trommelschlegelform als den eigentlichen Cellulosezersetzer beschrieben. Demgegenüber würde aber eine in der Kultur vorhandene Verunreinigung die stoffwechselphysiologischen Ergebnisse früherer Untersuchungen vielmehr beeinflussen können (z. B. der Methangärer *Omelianskis*).

Nun geben leider die Arbeiten der verschiedenen Autoren nicht immer eine ausreichende Auskunft darüber, welchen Reinheitsgrad die von ihnen verwendeten Chemikalien hatten und welcher Art die Sterilisationsmaßnahmen waren; ein Zeichen, daß dieser Frage oft ein zu

[1] Vgl. auch *L. E. den Dooren de Jong*, diese Zeitschr. **9**, 224, 1938.

geringes Gewicht beigelegt wurde. Zuweilen pflegt man ja absichtlich — mit Rücksicht auf etwa erforderliche Spurenstoffe — den weniger reinen Präparaten den Vorzug zu geben. In der folgenden Übersicht habe ich die in Frage stehenden Angaben zusammengestellt, soweit sie den betreffenden Arbeiten zu entnehmen waren.

P. Clausen: Cellulose: chem. rein (*Döhn & Sauer*, Leipzig-Plagwitz). — Calciumcarbonat: Kreide. — Sterilisation: *Koch*scher Dampftopf; fraktioniert.

C. Coolhaas: Cellulose: Filtrierpapier. — Calciumcarbonat: keine Angaben. — Sterilisation: Angaben fehlen.

Ph. B. Cowles u. *L. F. Rettger:* Cellulose: Filtrierpapierstreifen. — Calciumcarbonat: Qualität aus den Angaben nicht zu entnehmen. — Sterilisation: Autoklav (Temperatur ?).

K. F. Kellerman u. *I. G. Mc Beth:* Cellulose: chemisch rein (für die Kulturplatten). — Calciumcarbonat: keine Angaben. — Sterilisation: genauere Angaben fehlen.

Y. Khouvine: Cellulose: Papier *Berzélius* oder aus *Schweitzers* Reagens gefällte Cellulose. — Calciumcarbonat: keine genauen Angaben. — Sterilisation: Autoklav, $^1/_2$ Stunde bei 110° C.

F. Löhnis u. *G. Lochhead:* Cellulose: chem. rein (*König & Co.*, Leipzig-Plagwitz). — Calciumcarbonat: keine Angaben. — Sterilisation: keine Angaben.

R. Meyer: Cellulose: Filtrierpapierstreifen. — Calciumcarbonat: Kreide. — Sterilisation: *Koch*scher Dampftopf, fraktioniert, oder Autoklav, $^1/_2$ Stunde bei 130° C.

V. Meyer: Cellulose: Filtrierpapierstreifen. — Calciumcarbonat: Kreide. — Sterilisation: Autoklav, $^1/_2$ Stunde bei 110° C.

W. Omelianski: Cellulose: Cellulosen verschiedener Herkunft. — Calciumcarbonat: neben anderer auch chemisch reine und gefällte Kreide. — Sterilisation: keine Angaben.

J. Pochon: Cellulose: Filtrierpapier. — Calciumcarbonat: als Puffer Schaum von Zuckerfabriken; enthält 50% $CaCO_3$. — Sterilisation: an drei aufeinanderfolgenden Tagen $^1/_2$ Stunde auf 125° C, dazwischen im Brutraum bei 37° C.

St. Śniesko: Macht keine Angaben.

P. A. Tetrault, Cellulose: reinstes quantitatives Filtrierpapier. — Calciumcarbonat: keine Angaben. — Sterilisation: Angaben fehlen.

E. Werner: Cellulose: Filtrierpapierstreifen. — Calciumcarbonat: Kreide. — Sterilisation: keine genauen Angaben.

Diese Zusammenstellung sagt uns, daß in allen Kulturen der genannten Autoren Verunreinigungen vorhanden gewesen sein können.

Für die weiter unten mitgeteilten Versuche wurden folgende Grundsätze eingehalten: Es wurden die reinsten erhältlichen Chemikalien benutzt; als Calciumcarbonat ausschließlich „Calcium carbonicum praecipitatum p. A. *Merck*". Sterilisiert wurde ausschließlich im Autoklaven; und zwar jedes Gefäß bei 130° C $^1/_2$ Stunde, im ganzen dreimal mit einer Zwischenzeit von zwei oder drei Tagen. In der Zwischenzeit wurden die Gefäße im Brutraum bei etwa 35° C aufgestellt. Vor jeder Sterilisation wurde bis 20 mm Hg zwecks Entfernung etwa von dem Calciumcarbonat oder der Cellulose eingeschlossener Luft evakuiert. Das Evakuieren wurde mit den noch warmen Gefäßen vor-

genommen; es trat dann in den Gefäßen ein schwaches Sieden ein, wodurch die Luft besonders wirksam entfernt wurde. Dann wurden die mit Wattestopfen verschlossenen Gefäße längere Zeit bei Zimmertemperatur aufbewahrt, so daß angenommen werden konnte, daß sich die Nährlösung wieder mit Luft gesättigt hatte.

Mit dem so behandelten Nährsubstrat wurden neue Kulturen angelegt. In *einem* unterschieden sich diese neuen Kulturen grundsätzlich von den früheren: Während diese mit Beginn der Gasentwicklung (infolge sulfatreduzierender Vorgänge) einen unangenehmen, ekelerregenden Geruch annahmen, rochen die neuen Kulturen ausnahmslos angenehm fruchtartig aromatisch, und jede Spur einer Sulfatreduktion fehlte. Verfasser hat diese Beobachtung bisher nirgends angegeben gefunden, so daß er schon hieraus den Schluß zu ziehen geneigt ist, daß in den ihm bekannt gewordenen Fällen — wie ja auch die oben mitgeteilten Angaben vermuten lassen — keine Reinkulturen vorgelegen haben werden. Bei seinen Versuchen hat Verfasser von nun an stets den Geruch der Kultur als Reinheitskriterium mit herangezogen.

Versuche mit neu isolierten Cellulosezersetzern.

Es wurden zwei neue „Stämme“ isoliert, von denen der eine aus einem Versuch zur Prüfung der Reinheit der Chemikalien auf ihre Keimfreiheit aus der Kreide (vgl. S. 252) erhalten worden war. Dieser Stamm, der weiterhin als „Stamm C“ bezeichnet werden soll, bildete niemals Farbstoff, der Abbau der Cellulose ging außerordentlich träge vor sich und blieb im allgemeinen unvollständig. In einem Zeitraum von über drei Jahren konnten von diesem Cellulosezersetzer z. B. nur 12 Weiterimpfungen durchgeführt werden. Das mikroskopische Bild der Kultur zeigte im ganzen nur wenig Organismen, typische Trommelschlegelformen wurden nur selten gefunden; meist traten nur einige Stäbchen und ovale Sporen auf. Stoffwechselphysiologisch verhielt sich dieser Stamm jedoch — abgesehen von dem langsamen Ablauf der Vorgänge — ähnlich wie der andere Stamm, der aus dem Panseninhalt eines frisch im Göttinger Schlachthof geschlachteten Rindes isoliert wurde, und der als „Stamm P“ bezeichnet werden soll. Dieser Stamm bildet intensiv gelben Farbstoff (vgl. S. 270) und zersetzt die Cellulose recht lebhaft; im Verlaufe von 3 Jahren konnten 30 Weiterimpfungen erzielt werden. In den Kulturen wurden in der Regel reichlich charakteristische Trommelschlegelformen nachgewiesen, daneben aber auch Stäbchen, ovale, seltener runde, Sporen, Fäden und gelegentlich die früher vom Verfasser beschriebenen entarteten Formen (längere Fäden, zitronenartige Formen[1] und Stäbchen mit in der Mitte liegenden Anschwellungen).

[1] Vgl. *R. Meyer* (1).

Diese Stämme wurden nach dem *Khouvine*schen Waschverfahren in Verbindung mit $^1/_4$stündigem Erhitzen des Impfmaterials auf 80° C gereinigt[1]. Bereits nach wenigen Weiterimpfungen machten die Kulturen mikroskopisch und dem Geruch nach vollständig den Eindruck einer Reinkultur. Es zeigte sich jedoch sehr bald, besonders beim Stamm P, daß die Überimpfungen immer schlechter anwuchsen, wenn die Nährlösung in der angegebenen Zusammensetzung (vgl. S. 251, Fußnote 1) benutzt wurde[2].

Diese mußte also in geeigneter Weise abgeändert werden. Zunächst wurden zu jedem Gärgefäß etwa 0,1 % Kaliumsulfat zugesetzt, da die bisherige Nährlösung sulfatfrei war. Weiterhin wurden 0,01 % Ferrosulfat zugesetzt. Hierbei zeigte sich zum ersten Male, daß die *reine* Kultur Sulfat *nicht* reduziert, während die früheren Kulturen dies immer getan hatten. Durch diese Zusätze wurde das Wachstum jedoch nur unwesentlich gefördert. Ein Zusatz von 0,0004 % Kupfersulfat hemmte das Wachstum vollständig. Es konnte sich nur noch um das Fehlen von irgendwelchen anderen mineralischen Spurenstoffen, Vitaminen oder weiteren organischen Spurenstoffen handeln. Um diese festzustellen, wurden als Zusätze noch versucht: Erdextrakt, Panseninhaltextrakt, Hefeextrakt, Orangenextrakt (neutralisiert), gelber Farbstoff des Cellulosezersetzers (vgl. S. 270), Duftstoff des Cellulosezersetzers (vgl. S. 273), Vitamin B_1, Chlorophyll, Kulturextrakt des Cellulosezersetzers aus alten Kulturen, Wurzelspitzenextrakt vom Mais, Keimblätterextrakt (ergrünte Blätter) von Mais und Vitamin D. Von allen diesen Zusätzen zeigten nur die letzten *vier* einen merklich fördernden Einfluß. Am intensivsten wirkte der Extrakt von ergrünten Maiskeimlingen (vgl. dazu auch Tabelle I, S. 266), und zwar so, daß damit 30 Weiterimpfungen ohne wesentliche Einbuße an Wachstumsenergie ermöglicht wurden. Wenn man bedenkt, daß der anaerobe Cellulosezersetzer in erster Linie als Saprophyt des Wiederkäuerpansens anzusehen ist und erst in zweiter Linie als Bodenorganismus, in den er erst durch die Ausscheidungen hineingelangt[3], so liegt die Verwendung des grünen Blätterextraktes nahe; denn der Organismus wird sich den Umweltverhältnissen, besonders im Pansen der Wiederkäuer, weit-

---

[1] Zur hier angewandten Züchtungstechnik vgl. *R. Meyer* (1) u. (3); in die hier beschriebenen Versuche wurden allerdings im Gegensatz zu den früheren ausnahmslos Gärgefäße aus Jenaer Glas 20 von *Schott & Gen.*, Inhalt 250 ccm, mit engem Hals, benutzt. — [2] Bei *Rotmistrov* u. *Scharojko* wuchsen merkwürdigerweise die reineren Kulturen besser als die Anreicherungskulturen; von *Imšenecki* wird allerdings die Reinheit der Kultur dieser Autoren bezweifelt. — [3] Hierfür sprechen ja auch die Tatsachen, daß das Temperaturoptimum des (mesophilen) Cellulosevergärers bei etwa 37° C liegt, und daß sich — gemäß den obigen Versuchen — ein Zusatz von Erdextrakt als unwirksam erwiesen hat.

gehend angepaßt haben. Merkwürdig ist allerdings die Wirkungslosigkeit von Panseninhaltextrakt; aber es kommt wahrscheinlich gerade auf das *frisch* in den Pansen gelangende Material an. Auffallend ist die Wirkung des Vitamins D; es konnten mit diesem zwar nur zwei Versuche durchgeführt werden, aber der fördernde Einfluß war nicht zu übersehen.

Das Vitamin, als „Vigantol forte" *Merck* gegeben, ist nur fettlöslich; es wurde daher dem Impfmaterial im letzten Waschwasser ein kleiner Tropfen Vigantol forte zugesetzt und kräftig geschüttelt, so daß etwas von dem Material an den Cellulosefasern haften bleiben mußte. Obwohl in den beiden erwähnten Versuchen die Nährlösung bereits Keimblattextrakt enthielt, war doch noch ein fördernder Einfluß des Vitamins bemerkbar.

Die Beobachtungen mit dem Vitamin D legten es nahe, einmal Versuche mit UV-Bestrahlungen zu versuchen. Es wurde zu diesem Zwecke das Impfmaterial im letzten Waschwasser in ein Kölbchen aus Quarzglas getan und in drei verschiedenen Proben 5, 10 und 15 Minuten lang mit einer Quarzlampe bestrahlt. In zwei weiteren Proben wurde wieder 5 Minuten lang mit der Quarzlampe bzw. mit dem Cadmiumfunken bei 275 mμ bestrahlt. Ein Einfluß war nicht zu bemerken. Nur in der zweiten Quarzlampenprobe trat merkwürdigerweise Sulfatreduktion ein und im mikroskopischen Bilde erschien ein Teil der Stäbchen schwarz gefärbt (Sulfatreduktion im Bakterienkörper ?).

Der Maiswurzelspitzenextrakt erwies sich nur zu Anfang wirksam; die Wirkung klang aber bald ab. Ähnlich verhielt sich der Extrakt von alten Cellulosezersetzerkulturen, der durch Verreiben des Bodensatzes einer alten Kultur mit dest. Wasser und Ultrafiltrieren erhalten wurde. Der sich als am wirksamsten erweisende Keimblätterextrakt wurde folgendermaßen hergestellt:

Etwa 4 bis 5 g grüne Maiskeimblätter wurden in einer Reibschale zunächst mit 10 ccm dest. Wasser zu einem gleichmäßig dünnen Brei verrieben. Dann wurden 90 ccm dest. Wasser hinzugefügt und nochmals verrieben. Die Verreibung wurde 2 Stunden stehengelassen und dann zunächst die gröberen Bestandteile durch ein gewöhnliches Papierfilter abfiltriert. Das Filtrat wurde dann durch ein Membranfilter gesaugt, wobei ein hellbraunes Filtrat hindurchläuft. Dieses wurde zu je 5 ccm in Reagensgläser gefüllt und mindestens sechsmal bei 60° C pasteurisiert. Die Zeitabstände zwischen zwei Erhitzungen betrugen anfangs einen, zuletzt zwei Tage. Beim Pasteurisieren wurde der braune Ton des Extraktes tiefer. Der so erhaltene Extrakt zeigte auch nach wochenlanger Aufbewahrung keinerlei Trübung oder Bakterienwachstum. Jedes Kulturgefäß mit 250 ccm Cellulosemineral-Nährlösung erhielt 5 ccm Extrakt zugesetzt. In ähnlicher Weise waren auch die anderen oben aufgeführten Extrakte behandelt worden. Nur der Erdextrakt war durch Extraktion bei höherer Temperatur erhalten worden[1].

---

[1] Vgl. *R. Meyer* (3).

Die stärkere Wirkung des grünen Keimblattextraktes gegenüber dem Wurzelextrakt war die Veranlassung, einmal mit alkoholischem Keimblattextrakt Versuche zu machen. Der alkoholische Extrakt enthält im wesentlichen Chlorophyll. Dieser zeigte aber keinerlei Wirkung; die wirksamen Bestandteile des Blätterextraktes sind also nicht im Chlorophyll enthalten.

Zum Abbau der Cellulosefaser.

Von den Produkten des Abbaues der Cellulose durch den anaeroben Cellulosezersetzer kennt man mit Sicherheit nur einige Endglieder. Was an Zwischenprodukten auftritt, darüber gehen die Meinungen noch auseinander. Manche Autoren wollen Zucker nachgewiesen haben, entweder ohne weiteres oder nachdem durch bestimmte Zusätze zum Kultursubstrat der Ablauf des Celluloseabbaues im geeigneten Augenblick unterbrochen wurde; andere haben keine Zucker oder andere reduzierenden Substanzen nachweisen können.

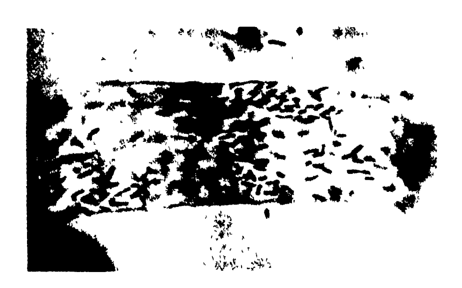


Abb. 1. Gerichtete Anordnung der Bakterien auf der Cellulosefaser. Vergr. 600mal. Aufnahmedaten vgl. S. 259.



Abb. 2. Gerichtete Anordnung der Bakterien auf der Cellulosefaser bei schräg zur Faserlängsrichtung verlaufenden Mizellarsträngen. Vergr. 700mal. Aufnahmedaten vgl. S. 259.

Im mikroskopischen Bild einer in Gärung befindlichen Kultur findet man die Cellulosefaser dicht mit Bakterien bedeckt; beim flüchtigen Hinsehen anscheinend in regelloser Anordnung. Meist handelt es sich dabei um noch sporenlose Stäbchen. Dieses Bild wird aber dadurch hervorgerufen, daß bei der Präparation die Lagerung eines Teiles der Stäbchen gestört wird; manche lösen sich dabei ganz von der Faser ab. Bei vorsichtiger Präparation findet man jedoch zuweilen, daß sich die Stäbchen *vorwiegend* der „fibrillären Struktur“ der Faser parallel lagern[1]. Es ist dabei gleichgültig, ob die Mizellarstränge parallel (Abb. 1) oder schräg (Abb. 2) zur Längsrichtung der Faser verlaufen, immer ist die Richtung der Mizellar-

[1] Vgl. auch *F. Baker* u. *R. Martin* (2), ferner *R. Meyer* (3).

stränge maßgebend für die Lagerung der Stäbchen. In besonderen Fällen, z. B. bei den Hoftüpfeln der Koniferentracheiden, machen die Stäbchen auch den abweichenden Verlauf der Mizellarstränge in den Tüpfeln mit, wie das z. B. Abb. 3 andeutet. Auch an ganz dünnen Faserenden beobachtet man Parallellagerung der Stäbchen zu den Mizellarsträngen, wie aus Abb. 4 hervorgeht.

Zu den optischen Daten der Abbildungen sei hier folgendes bemerkt: Zur besseren Darstellung der Verhältnisse wurde ein Teil der Aufnahmen im Polarisationsmikroskop[1], je nach Bedarf mit Polarisationsfiltern (Bernotaren von *C. Zeiss*) oder Kalkspatnikols, unter gekreuzten Schwingungsebenen von



Abb. 3. Anordnung der Bakterien um den Hoftüpfel einer Koniferentracheide. Vergr. 500 mal. Aufnahmedaten vgl. S. 259.



Abb. 4. Anordnung der Bakterien an einem dünnen Faserende. Vergr. 500 mal. Aufnahmedaten vgl. S. 259.

Analysator und Polarisator gemacht, wobei die Cellulosefaser in Diagonallage gebracht wurde. Sollte das Bildfeld zur gleichzeitigen Hervorhebung der Bakterien etwas aufgehellt werden, so wurden die Schwingungsebenen nicht ganz gekreuzt. Zur weiteren Hebung des Kontrastes wurde dann zuweilen noch für die mit Gentianaviolett oder Fuchsin gefärbten Bakterien ein geeignetes Komplementärfilter eingeschaltet (für Gentianaviolett: 15 mm gesättigte Auraminlösung; für Fuchsin: 15 mm Nilblau etwa 1 : 1000 und 15 mm gesättigte wässerige Auraminlösung; orthochromatische Platten). Für die Aufnahmen der Abb. 9 wurde, um die verschiedene Dicke der Cellulosefaser an verschiedenen Stellen darzustellen, als Kompensator Gips Rot I eingeschaltet und die Faser in Additionslage gebracht. In dem Beispiel erschienen die „Schuppen“ in Blau II, während die anderen Teile der Faser Purpur waren. Photographisch wurde der Kontrast hier erhöht durch Einschalten des Rotfilters RG 1 *Schott & Gen.* 2 mm und Verwendung einer panchromatischen Platte. Für die Aufnahmen wurden die *Zeiss*-Apochromate 40/0,95 und 20/0,65 in Verbindung mit Homal III benutzt.

Man könnte nun geneigt sein, diese Art der Lagerung der Stäbchen durch Adhäsionskräfte zu erklären, indem man etwa annähme, daß sich die Stäbchen leichter in vorgebildete „Rillen“ auf der Faser hineinlegen

[1] *Baker-Martin*, *Bailey-Vestal* und *Schulze* benutzen ebenfalls polarisiertes Licht zur Beobachtung des Abbaues der Cellulosefaser.

als sich quer dazu lagern. Indessen erscheint mir diese Erklärung nicht ausreichend. Schon die Tatsache, daß sich *nur* die Cellulosezersetzer, nicht aber auch andere Bakterien, in dieser Weise an die Faser anlegen und festhaften (vgl. Waschverfahren), deutet darauf hin, daß hier eine „Zweckhandlung“ vorliegen muß. Das Bakterium sucht gewissermaßen einen möglichst großen Teil seiner Oberfläche mit den die Faser aufbauenden Elementen in geeigneten Kontakt zu bringen. Warum dies geschieht, versteht man vielleicht am besten, wenn man sich den Aufbau der Cellulosefaser vergegenwärtigt, wie man sich ihn nach den Untersuchungen von *Staudinger*, *Frey-Wissling* u. a. vorzustellen hat:

Mehrere 100 bis 1000 (nach *Seifritz*[1] sogar 100000) Grundmoleküle der Glucose bilden in β-glucosidischer Bindung ein Fadenmolekül der Cellulose, welches somit eine Länge von der Größenordnung eines μ erreicht, also mit den Dimensionen eines Bakteriums vergleichbar wird. Diese Fadenmoleküle ordnen sich in kleinsten Räumen zu Kettengittern, was auch durch das Röntgendiagramm[2] bestätigt wird. Die native Cellulosefaser besteht nun jedoch nicht aus einem lückenlosen und ungestörten System solcher geordneter Bereiche (Mizelle)[3], sondern sie weist eine Lockerstruktur auf, d. h. diese Kettengitter werden solcherart miteinander verflochten, daß mehr oder weniger große Hohlräume zwischen ihnen verbleiben[4]. Dieser Aufbau ergibt sich aus dem polarisationsoptischen Verhalten der Faser (Stäbchendoppelbrechung). Diese Hohlräume, die inkrustierte Substanzen (Lignin, Mineralbestandteile) enthalten können, bilden mit dem Cellulosegerüst ein System gegenseitiger Durchdringung, was man durch Herauslösen der Inkrusten (Celluloseskelet) oder der Cellulose (Ligninskelet) zeigen kann[5]. Die Hohlräume bilden ein submikroskopisches und mikroskopisches Kapillarsystem, in welchem die extrafaszikuläre Saftleitung stattfindet, wie *Strugger* durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen nachweisen konnte.

Man kann nun annehmen, daß das Cellulosebakterium bestrebt ist, sich der Längsrichtung der Fadenmoleküle anzulegen — beide sind ja bezüglich der Längsausdehnung von der gleichen Größenordnung. Das Bakterium wird dadurch in die Lage versetzt, das Cellulosemolekül durch enzymatische Einwirkung an bestimmten (zunächst wenigen) Stellen zu sprengen. Geschieht dies an mehreren (quer-) benachbarten Stellen, so kann man sich vorstellen, daß an dieser Stelle zugleich mit dem chemischen Eingriff wegen der Lockerstruktur der Faser der Verband noch weiter gelockert und schließlich auch ihr mechanischer Zusammenhalt gelöst wird[6]. Noch verständlicher würde dieser Vorgang,

---

[1] Vgl. auch *K. H. Meyer* u. *A. J. A. van der Wyk*. — [2] *Frey-Wissling* (2). — [3] Wobei die Hauptvalenzketten mehrere Mizelle durchlaufen können. — [4] Von *Ruska* elektronenoptisch nachgewiesen. — [5] *Frey-Wissling* (1), *Bailey*. — [6] Vgl. hierzu auch *Baker* u. *Martin*. Ein Verschwinden der Doppelbrechung der Faser, wie sie diese Autoren beschreiben, konnte vom Verfasser allerdings nicht beobachtet werden; soweit überhaupt noch feststellbar, zeigten auch die kleinsten Trümmer Doppelbrechung. Vielleicht ist der Unterschied darauf zurückzuführen, daß *Baker* u. *Martin* nicht mit Reinkulturen arbeiteten (Bakterienpseudomorphose? Vgl. S. 263).

wenn man annimmt, daß das Bakterium sich diesen Aufbau der Cellulosefaser derart zunutze machen kann, daß es kurze Plasmaausläufer etwa in die Hohlräume der Faser hineinversenkt; zugleich würde dies auch das feste Anhaften des Bakteriums an der Faser erklären, worauf ja das *Khouvine*sche Waschverfahren beruht. Mit der Zeit müßte so der

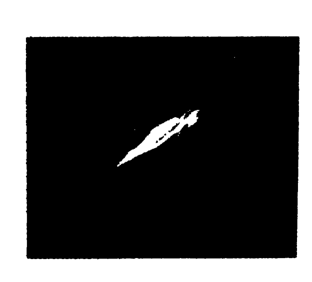


Abb. 5. Trümmer mittlerer Größe einer Cellulosefaser. Vergr. 500 mal. Aufnahmedaten vgl. S. 259.



Abb. 6. Kleine Trümmer einer Cellulosefaser. Vergr. 500 mal. Aufnahmedaten vgl. S. 259.

ganze Verband der Faser in mehr oder weniger große Stücke auseinanderbrechen, und zwar wegen der Lockerstruktur der Faser und der Fadenform der Cellulosemoleküle unter einem relativ kleinen chemischen Auf-



Abb. 7. Scheinbare Sternbildung von Cellulosezersetzern an sehr kleinen Trümmern einer Cellulosefaser. Vergr. 500 mal. Aufnahmedaten vgl. S. 259.



Abb. 8. Zackige Ausbrechung und rhombische Korrosionsfiguren eines Trümmerstückes einer Cellulosefaser. Vergr. 750 mal. Aufnahmedaten vgl. S. 259.

wand. Nun findet man in der Tat in älteren Kulturen des Cellulosezersetzers eine Unmenge solcher Fasertrümmer der verschiedensten Größe, teils freischwebend in der Kulturflüssigkeit, teils noch mit Faserresten zusammenhängend[1]. Die Abb. 5 und 6 zeigen solche Fasertrümmer. Sind sehr kleine Fasertrümmer noch mit Bakterien behaftet, so erhält

[1] Vgl. auch *Hooper*.

man oft den Eindruck, als seien die Bakterien verzweigt [vgl. *R. Meyer* (1), Abb. 9] oder neigten sie zur „Sternbildung" (Abb. 7). Eigentümlich ist für diese Trümmer oft die zackige Ausbrechung an den Enden oder das Auftreten von Korrosionsfiguren in der Faser als charakteristische, oft rhombisch geformte Lücken, wobei die größere Diagonale des Rhombus in die Längsrichtung der Faser fällt (Abb. 8); in anderen Fällen sitzen solche Rhomben als erhabene „Schuppen" oder Leisten auf den Faserresten (Abb. 9). Diese Art der Korrosionsfiguren steht ganz im Einklang mit der Auffassung von *Frey-Wissling* gemäß einer Verzahnung der Kettengitter in der Längsrichtung der Faser[1]. Die Größe der spitzen Winkel dieser Zacken, Lücken oder Schuppen schwankt etwas; am häufigsten liegen die Werte aber zwischen 30 und 50°[2].

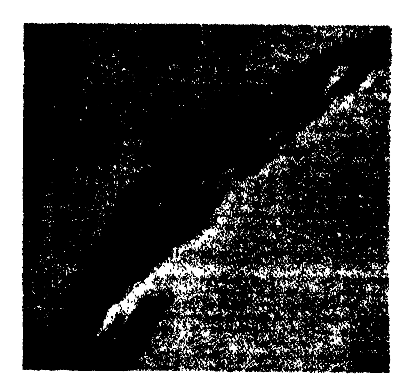


Abb. 9. Rhombische „Schuppen" auf einer Cellulosefaser. Vergr. 750mal. Aufnahmedaten vgl. S. 259.

Diese Beobachtungen zeigen, daß bei der Cellulosegärung kein eigentliches Ektoenzym wirksam sein kann, denn Korrosionsfiguren entstehen — örtlich begrenzt — nur an solchen Stellen der Faser, die auch von Bakterien besetzt sind (Abb. 10). Wäre ein Ektoenzym wirksam, so müßte der Zerfall der Fasern in der ganzen Kultur ziemlich gleichmäßig erfolgen, und man müßte auch an den unbesetzten Stellen der Faser Korrosionsfiguren finden. Weiter spricht dafür auch die Langsamkeit des Vorganges. Von diesen Korrosionsstellen her schreitet — unter gleichzeitiger Vermehrung der Bakterien — der Abbau der Cellulosefaser fort, so daß bald nur noch ein lockeres Gerüst (Abb. 11) oder bei Schrauben-



Abb. 10. Mit Bakterien besetztes Loch in einer Cellulosefaser. Vergr. 500mal. Aufnahmedaten vgl. S. 259.

[1] Ähnliche Korrosionsfiguren und Trümmer konnte Verfasser auch bei der aeroben Cellulosezersetzung nachweisen (nicht veröffentlicht). — [2] *Bailey* u. *Vestal* fanden Winkel zur Achse der Fibrillen von 20 bis 25°. Da vom Verfasser die doppelten Winkel gemessen wurden, kann man die Übereinstimmung als leidlich bezeichnen.

textur einige „Rippen" (Abb. 12) stehenbleiben. In den Endstadien findet man zuweilen nur noch an den Rändern der Faser einige Trümmer, während die übrigen Teile der Faser (bei sorgfältiger Präparation) als Bakterienpseudomorphose erscheinen (Abb. 13).

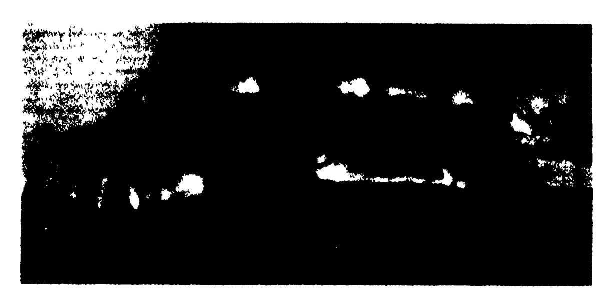


Abb. 11. Lockeres Gerüst einer Cellulosefaser. Vergr. 750mal. Aufnahmedaten vgl. S. 259.

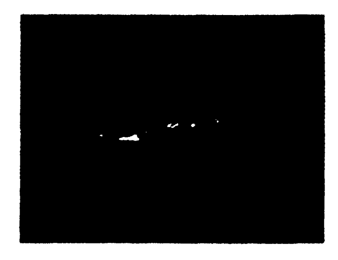


Abb. 12. Übriggebliebene „Rippen" einer Cellulosefaser mit Schraubentextur. Vergr. 400mal. Aufnahmedaten vgl. S. 259.



Abb. 13. Bakterienpseudomorphose einer Cellulosefaser mit Trümmerstücken am Rande. Vergr. 400mal. Aufnahmedaten vgl. S. 259.

In manchen Fällen verläuft der Abbau etwas anders, was sich schon durch das makroskopische Bild zu erkennen gibt. In der Regel pflegt sich ja zu Beginn der Gärung der ganze Cellulosestreifen oder doch wenigstens ein mehrere Millimeter großer Bezirk gelb zu färben, oder, bei farblosen Vergärern, welk zu

werden. Seltener kommt es vor, daß man auf den Cellulosestreifen nur stecknadelkopfgroße Löcher findet, wie dies Abb. 14 zeigt. Bei stärkerer Vergrößerung kann man nun feststellen, daß in diese Löcher zugespitzte Cellulosefasern hineinragen (Abb. 15). Die Fasern werden in diesem Falle also nicht von der Seite, sondern von einem Ende her angegriffen. Warum in einigen Fällen das eine, in anderen das andere, und zwar auch innerhalb der Überimpfungsreihe ein und derselben Kultur, eintritt, konnte nicht ermittelt werden. Es wäre denkbar, daß dies mit der Beweglichkeit der Jugendformen zusammenhängt, indem diese bei den Löcherkulturen aus irgendeinem Grunde gehemmt ist, und ein Wachstum nur da erfolgt, wo beim Impfen eine Spore zu liegen kam. Mit zunehmendem Alter der Kultur pflegt sich an diese Art des Celluloseangriffs schließlich der allgemeine Zerfall der Cellulose wie bei den anderen Kulturen anzuschließen.

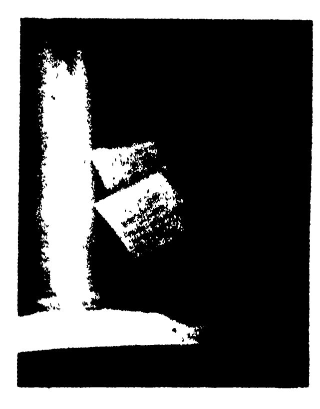


Abb. 14. Filtrierpapierstreifen, die in einzelnen Löchern angegriffen werden. Natürliche Größe.

Gegen Ende der Cellulosegärung findet man in der Kultur fast nur noch Fasertrümmer neben Bakteriendetritus und Sporen. Aber man kann im Bodensatz selbst ein Jahr alter Kulturen immer noch vereinzelte intakte Cellulosefasern nachweisen, auch dann, wenn der Abbau anfangs sehr intensiv war. Eine vorherige Verquellung der Cellulosefaser, wie sie von *Werner* angegeben wird, konnte niemals beobachtet werden, weder in der jungen noch in der fortgeschrittenen Kultur.



Abb. 15. Zugespitzte Cellulosefasern in einem Loch eines Cellulosestreifens. Vergr. 180mal. Aufnahmedaten vgl. S. 259.

Das mikroskopische Bild gibt uns also schon einigen Aufschluß darüber, wie man sich den Beginn des Abbaues der Cellulosefaser vorzustellen hat. Es entsteht nun die Frage, welches das weitere Schicksal der Cellulosetrümmer in der Kultur ist. Daß die — auch

mechanische — Zerteilung der Trümmer bis weit ins submikroskopische Gebiet hineinreicht, darüber kann kein Zweifel bestehen; denn auch die kleinsten Trümmer hängen oft noch fest mit den Bakterien zusammen. Nun liegt die Annahme nahe, daß die Aufspaltung der Cellulose durch Hydrolyse über die niederen Polymerisationsgrade schließlich zur Cellobiose und Glucose führt, die dann durch Gärung zu den als Endprodukten auftretenden organischen Säuren und den weiteren noch beobachteten Stoffwechselprodukten führt.

Bezüglich der Zwischenprodukte sind wir aber — wie bereits erwähnt — noch völlig im unklaren. Manche Autoren, z. B. *Pringsheim* (1), *V. Meyer*, *Tetrault*, *Imšenecki* (3), (5) u. a. wollen Zwischenprodukte wie Cellobiose und Glucose oder Zucker unbestimmter Art nachgewiesen haben. Von anderen Autoren wird jedoch das Auftreten solcher Zwischenprodukte bestritten[1]. Verfasser konnte *Fehling*sche Lösung reduzierende Substanzen in der Kultur nicht nachweisen. Wenn solche auftreten, müssen sie jedenfalls schnell weiterverarbeitet werden. Ob Kohlenhydrate als Zwischenprodukte überhaupt zu erwarten sind, hängt wohl in erster Linie davon ab, ob die chemischen Eingriffe des Bakteriums vorwiegend hydrolytischer oder oxydativer Natur sind. Verfasser möchte vorläufig zu der Ansicht neigen, daß — wenigstens zu Anfang — die oxydativen Eingriffe überwiegen und möchte als wichtigstes Argument dafür den Verbrauch von Sauerstoff *vor* Beginn der sichtbaren Gärung anführen[2]. Man muß demnach damit rechnen, daß bereits die größeren Bruchstücke des Cellulosemoleküls sauerstoffreicher sein können als das Cellulosemolekül selbst[3] und daß weiterhin z. B. Cellobiose und Glucose nicht unbedingt als Zwischenprodukte aufzutreten brauchen.

Von den Stoffwechselprodukten treten mengenmäßig die organischen Säuren in den Vordergrund, und zwar in erster Linie Essigsäure, in weit geringerer Menge Buttersäure. Ameisensäure und Propionsäure konnte Verfasser im Gegensatz zu den Ergebnissen einiger anderer Autoren[4] in den Kulturen der neu isolierten Stämme nicht nachweisen.

[1] *Rotmistrov* (2) u. (3); Verfasser konnte auf der filtrierten restlichen Nährlösung keine Hefen zum Anwachsen bringen. — [2] Es besteht auch noch die Möglichkeit, daß dieser Sauerstoff oder ein Teil desselben durch das Impfmaterial zur Atmung verbraucht wird; hierfür würde die Tatsache sprechen, daß der Sauerstoff verbraucht ist, bevor eine sichtbare Veränderung der Cellulose eintritt. Andererseits beobachtet man jedoch in cellulosefreier Minerallösung eine merkliche Verzögerung im Sauerstoffverbrauch [*R. Meyer* (3)], so daß eine Entscheidung auf Grund der vorliegenden Versuchsergebnisse noch nicht möglich ist. — [3] Vielleicht würde eine Prüfung nach der Methode von *Müller* hier eine Entscheidung zulassen. Methoden zur Bestimmung des Redoxpotentials in Kulturen anaerober Cellulosezersetzer gibt *Bojarskaja* an. — [4] Vgl. *Imšenecki*, *R. Meyer*, *V. Meyer*, *Rotmistrov* u. a. *V. Meyer* fand Buttersäure nur bei Anwesenheit von *B. coli*.

Tabelle I.

1	2	3	4	5	6	7
Kultur	Wachstumszeit Tage	Verbr. Cellulose g	Essigsäure g	Buttersäure g	Buttersäure %	E : C [1]
P 14 [2]	165	4,26	2,01	0,03	1,6	0,46
P 16	66	1,70	0,68	0,12	14,9	0,40
P 17	50	1,04	0,40	0,11	21,5	0,39
P 17	27	—	0,31	0,02	5,3	—
P 18	91	0,95	0,53	0,03	5,2	0,56
P 18 [3]	91	1,78	0,58	0,02	4,0	0,33
P 19	67	1,39	0,57	0,02	3,1	0,41
P 19 [3]	67	1,71	0,48	0,02	3,6	0,28
P 20	32	0,80	0,29	0,01	4,0	0,36
P 20 [4]	144	1,50	0,60	0,01	2,4	0,40
P 20 [4]	144	1,26	0,36	0,01	3,0	0,29
P 20	144	1,25	0,61	0,02	2,9	0,49
P 20	144	1,14	0,41	0,01	2,2	0,36
P 20	41	1,36	0,56	0,02	3,9	0,41
P 21	143	1,64	0,57	0,01	2,1	0,35
P 21	20	0,05	0,05	0,01	13,4	(0,94) [6]
P 21	74	—	0,45	0,01	2,4	—
P 22	70	—	0,66	0,02	3,5	—
P 22	60	1,08	0,46	0,01	2,8	0,42
P 22 [4]	60	1,45	0,53	0,02	2,9	0,37
P 23	115	1,64	0,79	0,03	3,4	0,48
P 23 [4]	56	1,74	0,48	0,02	4,6	0,28
P 25	72	1,48	0,50	0,01	2,9	0,34
P 25 [5]	72	0,97	0,32	0,01	2,4	0,33
P 25	63	1,42	0,60	0,02	3,9	0,42
P 25 [5]	63	0,98	0,54	0,02	2,9	0,55
P 25 [5]	63	1,09	—	—	—	—
P 26	23	0,75	0,13	0,01	5,0	0,19
P 29	197	1,62	0,20	0,01	6,2	0,12
P 29	197	1,30	0,60	0,03	5,1	0,46
P 29 [5]	197	1,20	0,54	0,04	7,1	0,45
P 29	197	1,41	0,62	0,03	4,6	0,44
P 29 [5]	197	1,45	0,61	0,05	7,4	0,42
C 6	465	1,69	0,31	0,07	18,9	0,18
C 7	482	1,81	0,76	0,05	6,2	0,42
C 8	380	1,80	0,66	0,04	5,3	0,37
C 10	80	0,42	0,18	0,07	3,6	0,43

[1] Verhältnis von Essigsäure zu verbrauchter Cellulose. Die Werte der Spalten 6 und 7 wurden aus den dreistelligen Zahlen des Versuchsprotokolls errechnet; für die Tabelle wurden diese Zahlen auf zwei Dezimalen abgerundet. — [2] Material von drei Gärgefäßen zusammengetan. Die Ziffer hinter der Bezeichnung des Stammes gibt die Stelle in der Folge der Weiterimpfungen an. — [3] Diese Kulturen erhielten im Gegensatz zu den gleichstelligen einen Zusatz von Maiskeimblattextrakt; die späteren erhielten diesen regelmäßig. — [4] Diese Kulturen erhielten anstatt Filtrierpapierstreifen gereinigte Cellulose. Diese war folgendermaßen hergestellt: 150 g reinstes Rohmaterial für Filtrierpapier, welches von der Firma *Schleicher & Schüll*, Düren, freundlichst zur Verfügung gestellt war, wurden in 4 Liter 5 %ige Natronlauge eingetragen und häufig umgerührt. Nach drei Tagen mit Leitungswasser gründlich ausgewaschen und in Salzsäure (400 ccm konz. Salzsäure auf 4 Liter Wasser) (vgl. *Farr-Eckerson* u. *Bonner*) eingetragen. Nach zwei weiteren Tagen in fließendem Leitungswasser 3 Stunden lang ausgewaschen und auf der Nutsche mit destilliertem Wasser nachgewaschen. Dann im Brutraum einen Tag bei 30° C vor- und im Trockenschrank bei 105° C bis zur Gewichtskonstanz nachgetrocknet. Dann mit Alkohol, mit Äther und wieder mit Alkohol gewaschen. Schließlich wurde wieder auf der Nutsche mit destilliertem Wasser gewaschen, eine Woche lang in destilliertem Wasser stehengelassen, nochmals abgenutscht, im Trockenschrank bei 80 bis 90° C vor- und bei 110° C bis zur Gewichtskonstanz nachgetrocknet. Da die gereinigte Cellulose günstiger wirkte, wurde diese für die späteren Weiterimpfungen in der Regel verwendet. — [5] Diese Gärgefäße waren bis zum Hals mit Nährlösung angefüllt, so daß den Kulturen nur wenig Sauerstoff zur Verfügung stand. — [6] Dieser Wert wurde bei der Berechnung der Mittelwerte nicht berücksichtigt, da die Bestimmung der geringen Menge flüchtiger Säuren zu unsicher erschien.

Tabelle I zeigt die in verschiedenen Kulturen dieser Stämme beobachteten Mengen Essigsäure und Buttersäure neben der verbrauchten Cellulose und dem Alter der einzelnen Kulturen. Die flüchtigen Säuren wurden durch Wasserdampfdestillation aus dem Eindampfrückstand der restlichen Nährlösungen gewonnen und dann getrennt[1].

Im einzelnen streuen die Werte der Tabelle I ziemlich stark, insbesondere der Prozentgehalt der flüchtigen Säuren an Buttersäure. Dieser beträgt beim Stamme P im Mittel aus sämtlichen Beobachtungen 5,0; das Ausmaß der Streuung (mittlere Abweichung des Mittelwertes 0,76) wird dabei in erster Linie durch einige wenige Extremwerte bedingt, deren Ursache allerdings nicht ersichtlich ist. Für den Stamm C liegt der Buttersäuregehalt bei 8,5 %; aber die Sicherheit dieses Wertes ist wegen der geringen Anzahl der Beobachtungen noch kleiner als der für Stamm P. Besser gesichert erscheint der Anteil der je Einheit verbrauchter Cellulose gebildeten Essigsäure; er beträgt im Mittel der Beobachtungen für Stamm P 0,38 ± 0,02, für Stamm C 0,33*. Ein Gang dieser Werte mit den Kulturbedingungen, insbesondere dem Alter der Kultur, geht aus der Tabelle I nicht hervor. Man kann aber aus der Tabelle ersehen, daß Mangel an freiem Sauerstoff den Wert der verbrauchten Cellulose herabsetzt, ohne daß dadurch jedoch die Anteile der flüchtigen Säuren beeinflußt werden[2].

Der Gasstoffwechsel des Cellulosezersetzers wurde bereits früher untersucht. Obwohl gegenüber den diesbezüglichen Versuchen des Verfassers keine Überraschungen zu erwarten waren, da für diese bereits das reinste Calciumcarbonat verwendet worden war, wurden dennoch für den Stamm P bei den Kulturen P 20 und P 29 zwei Gasstoffwechselversuche mit je vier Parallelen a bis d durchgeführt, die aber die früheren Beobachtungen — wenigstens qualitativ — nur bestätigen. Die Ergebnisse zeigt Tabelle II.

Zu der Menge des aufgefangenen Kohlendioxyds kommt noch diejenige hinzu, die in der restlichen Nährlösung in den Kulturgefäßen als Gas oder als Calciumbicarbonat enthalten ist. Diese konnte für die Parallelen der Kultur P 20 durch Auffangen in Barytlauge bestimmt werden zu:

a) 49,9 ccm; b) 47,5 ccm; c) 27,0 ccm und d) 43,3 ccm.

Die geringe Menge in der Parallelen c ist wohl auf die absolut geringe Menge des in diesem Kulturgefäß gebildeten Kohlendioxyds zurückzuführen (vgl. Tabelle II) die zur Sättigung der Lösung nicht ausreichte.

---

[1] *G. Klein*, Handbuch der Pflanzenanalyse, Band II. Wien 1932. —
[2] *Rotmistrov* (2) fand 25 bis 50 % Essigsäure und 6 bis 25 % Buttersäure unter den flüchtigen Säuren, 30 bis 60 % Gesamtsäure in bezug auf die verbrauchte Cellulose. *Tscheltzowa* findet das Verhältnis Essigsäure zu Buttersäure wie 1 : 1, bei stärkerer Luftzuführung jedoch 3,5 : 1 bis 4,7 : 1. *Śnieszko* (2) findet etwa 50 % Essigsäure der verbrauchten Cellulose. *Khouvine* fand auf 1,012 g verbrauchte Cellulose 0,275 g Essigsäure und 0,033 g Buttersäure.

Tabelle II.

Kulturen P 20a bis d				Kulturen P 29a bis d			
Wachstumszeit Tage	CO_2* ccm	H_2* ccm	O_2* ccm	Wachstumszeit Tage	CO_2* ccm	H_2* ccm	O_2* ccm
40	24,2	0,7	0,7	32	24,4	0,0	2,0
144	58,3	2,2	0,9	66	63,3	1,1	2,0
144**	71,4	3,4	1,2	197	99,5	6,8	2,9
64	18,5	0,0	0,1	113	46,0	0,6	0,9
144	28,2	0,0	0,2	197	54,5	1,8	5,4 (?)
144**	43,6	0,0	0,4				
144	11,8	0,2	0,4	37	27,9	0,5	0,2
144**	20,6	1,1	0,5	197	59,6	3,7	0,6
				197**	80,3	8,7	1,8 ***
64	20,5	0,0	0,2	66	40,1	2,8	0,0
144	33,9	1,2	0,4	197	64,0	5,7	0,1
144**	48,8	1,4	0,4				

* Bezogen auf 0° C und 760 mm Hg. — ** Diese Angaben beziehen sich auf das über der Nährflüssigkeit verbliebene Gas, welches durch abgekochtes destilliertes Wasser verdrängt und gesondert aufgefangen wurde. Zur Technik vgl. *R. Meyer* (3). — *** Während der Analyse Luft hinzugetreten.

Die gefundene Kohlendioxydmenge muß zum größten Teile oder ganz durch die organischen Säuren aus dem zur Neutralisation zugesetzten Calciumcarbonat freigemacht worden sein. Denn wenn man — ganz summarisch — annimmt, daß die beobachtete Essigsäuremenge durch Oxydation aus der Cellulose entstünde, so würden sich für die Kulturen P 20 und P 29 im Mittel der Beobachtungswerte folgende Verhältnisse ergeben:

Tabelle III.

	P 20	P 29
Beobachtete Essigsäuremenge	0,50 g	0,59 g
Verbrauchte Cellulose, beobachtet	1,29 „	1,34 „
Verbrauchte Cellulose, berechnet	0,53 „	0,64 „
Beobachtete Kohlendioxydmenge	88 ccm	116 ccm*
Berechnete Kohlendioxydmenge	166 „	198 „
davon unmittelbar aus Cellulose	74 „	88 „
davon mittelbar aus Calciumcarbonat	92 „	110 „
Verbrauchte Sauerstoffmenge	etwa 10 „	etwa 10 „
Verbrauchte Sauerstoffmenge, berechnet	74 „	88 „

* Für P 29 wurde zu dem Wert aus Tabelle II noch ein Wert von 41 ccm, dem Mittel aus der für die Kulturen P 20 erhaltenen Werte des in der restlichen Nährlösung enthaltenen Kohlendioxyds, hinzugefügt. Das konnte ohne allzu großen Fehler geschehen, weil Größe der Kulturgefäße, Zusammensetzung und Menge der Nährlösung und die Temperatur n beiden Fällen die gleichen waren.

Tatsächlich verläuft der Vorgang natürlich nicht so, und die Tabelle III zeigt, daß die von der beobachteten Essigsäuremenge aus dem zugesetzten Calciumcarbonat freigemachte Kohlendioxydmenge in beiden Fällen schon allein genügt, um die beobachtete Menge Kohlen-

dioxyd zu erklären. Die Zahlen lassen also die Vermutung zu, daß beim Abbau aus der Cellulose unmittelbar kein Kohlendioxyd freigemacht wird. In der Tabelle III ist noch die Menge Sauerstoff angegeben, die erforderlich wäre, um die Cellulose gemäß der oben gemachten Annahme in Essigsäure überzuführen, wobei wieder die beobachtete Essigsäuremenge zugrunde gelegt wurde (die geringe Menge Buttersäure wurde außer acht gelassen). Da diese Sauerstoffmenge nun nicht restlos aus der über der Nährlösung in den Kulturgefäßen belassenen Luft stammen kann — diese betrug in der Regel etwa 50 ccm, enthielt also etwa 10 ccm Sauerstoff —, so muß das Sauerstoffdefizit anderweitig gedeckt sein, und zwar aus der Cellulose bzw. dem Wasser. In der Tat ist auch die beobachtete Menge verbrauchter Cellulose weit größer als sie sich auf Grund der obigen Annahme aus der beobachteten Menge Essigsäure ergeben würde[1]. Wir müssen dann aber als Endprodukte noch weitere sauerstoffärmere Stoffe erwarten. Nun war von verschiedenen Autoren, auch vom Verfasser, Äthylalkohol unter den Endprodukten nachgewiesen[2], und da andere sauerstoffarme Endprodukte in größerer Menge nicht gefunden wurden, kommt er allein in Frage. Leider konnte der Äthylalkohol in den obigen Versuchen nur qualitativ nachgewiesen werden, da die restliche Kulturflüssigkeit für andere Untersuchungen verwendet werden sollte, so daß eine Bilanz einstweilen noch nicht aufgestellt werden kann.

Unklar ist noch die Rolle, die der in manchen Kulturen beobachtete Wasserstoff spielt. Mengenmäßig fällt er für die Stoffwechselbilanz kaum ins Gewicht. Auch ist nicht ersichtlich, durch welche Nebenumstände sein Erscheinen bedingt wird. Nur soviel geht aus den Versuchen hervor, daß er erst gegen Mitte bis Ende der Gärung festgestellt werden kann. Einstweilen erscheint noch die Annahme am meisten plausibel, daß es unter den Cellulosevergärern Formen gibt, die Wasserstoff erzeugen, und andere, denen diese Fähigkeit abgeht, und daß je nach Zufall jene mehr oder weniger in den Vordergrund treten.

Neben diesen Stoffwechselendprodukten, die für die Stoffwechselbilanz mehr oder weniger ins Gewicht fallen, findet man noch andere Stoffe, die zwar für die Stoffwechselbilanz mengenmäßig ziemlich bedeutungslos sind, die aber in mancher Hinsicht gerade der Cellulosezersetzung durch *Bacillus cellulosae-dissolvens* eigentümlich sind. Diese sollen im folgenden noch charakterisiert werden.

---

[1] Ein geringer Teil der Cellulose ist für den Baustoffwechsel verbraucht. — [2] *Imšenecki* (5); *Rotmistrov* (2) fand 2 bis 23% (!) der verbrauchten Cellulose; *Rotmistrov* u. *Sherbakova*; *Rotmistrov* u. *Scharojko* fanden 7 bis 10% der vergorenen Cellulose, *Śnieszko* (1) fand 0,25%, *Khouvine* (1) fand 0,082 g Äthylalkohol auf 1,012 g verbrauchter Cellulose. Bei *Rotmistrov* u. *Scharojko* ist die Alkoholausbeute vom p_H der Nährlösung abhängig.

Der gelbe Farbstoff.

Von den beiden untersuchten Stämmen war der Stamm P zur Farbstoffbildung befähigt. Wie bereits früher vom Verfasser mitgeteilt [*R. Meyer* (1)], ändert sich der Sättigungsgrad der Farbe mit der Anzahl der fortlaufenden Überimpfungen. Meistens hat man zu Beginn, wenn die Kulturen noch weniger rein sind, kaum Farbstoffbildung. Diese setzt im Laufe der Weiterimpfungen mit zunehmender Reinheit der Kultur ein und erreicht dann ein Maximum. Mit dem Abklingen der Farbstoffbildung in den späten Weiterimpfungen pflegt dann auch die Gärkraft des Erregers zu erlöschen. In der Überimpfungsreihe des Stammes P kommt dies nicht so klar zum Ausdruck, weil mit den frühen Überimpfungen dieses Stammes andere Versuche verbunden waren und die Zusammensetzung der Nährlösung mehrfach geändert worden war. Jedoch scheint mit der 26. bis 27. Überimpfung der höchste Sättigungsgrad erreicht worden zu sein, wie folgende Übersicht andeutet:

Tabelle IV.

Farbcharakter *	Kultur	Farbcharakter	Kultur
3 pa	P 26	2 ga	P 23, P 25
3 pc	P 27	2 gc	P 25, P 29
2 nc	P 29	2 ea	P 21, P 29
2 ia	P 27	1 ca	P 25, P 29
2 ic	P 27		

* *W. Ostwald*, Die kleine Farbmeßtafel. Zu beziehen von der „Phywe" Göttingen.

Natürlich ändert sich der Farbcharakter auch mit dem Alter der einzelnen Abimpfung; der höchste Sättigungsgrad wird meist kurz vor oder zu Beginn der Gasbildung erreicht. Später wird er dann meist wieder etwas unreiner (größerer Graugehalt); aber auch in ausgegorenen Kulturen ist der Bodensatz immer noch deutlich gefärbt. Ob der Farbstoff für die Gärung, etwa als Sauerstoffüberträger, irgendeine Rolle spielt, läßt sich nicht sagen. Einerseits scheint zu seiner Bildung Sauerstoff — wenigstens in Spuren — erforderlich zu sein; so gelang es Verfasser z. B. nicht, größere Mengen Farbstoff zu erhalten durch Verwendung größerer Kulturgefäße[1], weil dann der Sauerstoffzutritt eingeschränkt ist. Andererseits vermögen jedoch auch Erreger ohne Farbstoffbildung, wie z. B. Stamm C, die Cellulose abzubauen, wenn auch sehr viel langsamer. In Versuchen mit dem Stamm P, bei denen der Ammoniakstickstoff der Nährlösung durch Nitratstickstoff ersetzt war, trat die Farbstoffbildung mit erheblicher Verzögerung erst nach Beginn der Gärung ein.

[1] *R. Meyer* (1).

Der gelbe Farbstoff scheint in das kapillare Hohlraumsystem der Cellulosefaser eingelagert oder seine Moleküle der Faser gerichtet angelagert zu sein; denn die Gelbfärbung ist dichroitisch, und sie erscheint — wie bei der Chlorzinkjod- oder Kongorotfaser — am intensivsten, wenn die Schwingungsrichtung des Lichtes parallel zur Längsrichtung der Faser liegt. Liegt sie senkrecht dazu, dann erscheint die Faser vollkommen farblos. Im Fluoreszenzmikroskop erscheint die gefärbte Faser ziegelrot (etwa 4 pc). Es scheint sich dabei aber nicht um eine Eigenfluoreszenz des gelben Farbstoffs zu handeln; diese konnte z. B. an seinen Lösungen nicht beobachtet werden (vgl. weiter unten). Vielmehr wird es so sein, daß der Farbstoff den kurzwelligen Anteil des bläulichweißen Fluoreszenzlichtes absorbiert, welches bei allen Fasern in der gärenden Kultur zu beobachten ist (vgl. weiter unten). Das ziegelrote Licht ist polarisiert.

Verdünnte Salzsäure läßt den gelben Farbton der Cellulose für einige Sekunden in ein Fleischrot, etwa 5 pa für Cellulose aus der intensiv organgegelb gefärbten Kultur P 26, umschlagen. Nach längerer Einwirkung verschiebt sich der Farbton nach schmutziggelb bis schmutziggrün unter Zerstörung des Farbstoffs; denn ein Zusatz von Lauge stellt den ursprünglichen Farbton nicht wieder her. Schwache Laugen bewirken keine merkliche Veränderung des Farbtones, höchstens eine geringe Weißverhüllung.

Von den gebräuchlichen organischen Lösungsmitteln löst sich der gelbe Farbstoff leicht in Methylalkohol und Äthylalkohol; die Löslichkeit im ersteren ist wohl noch etwas besser als im letzteren, weil mit Methylalkohol extrahierte Cellulose völlig farblos zurückbleibt, während sie nach der Äthylalkoholextraktion noch ein wenig gelblich bleibt. Ganz wenig löst sich der gelbe Farbstoff noch in n-Propylalkohol; dagegen ist er nicht mehr löslich in iso-Propylalkohol und den höheren aliphatischen Alkoholen, die bis zum Hexylalkohol untersucht wurden. Nicht löslich ist der gelbe Farbstoff ferner in Ammoniak, Petroläther, Chloroform, Tetrachlorkohlenstoff, Benzol und Benzylalkohol[1]. Ganz schwach gelblichbräunlich färbt sich Aceton, ganz schwach gelblich 40 %iges Formalin und Acetaldehyd. Bei der Lösung in letzterem entstand in einem Falle beim Eintrocknen auf dem Filter ein rosenroter Ring. In einem Falle, nämlich bei der intensiv gefärbten Kultur P 26, wurde beim Waschen der Cellulose mit heißem Wasser eine ganz schwache Gelbfärbung des letzteren beobachtet. In alten Kulturen ist auch oft die restliche Nährlösung gelbstichig, etwa wie Weißwein. Ob es sich hierbei um den gleichen gelben Farbstoff handelt, ist fraglich.

[1] *Khouvine* (1) fand ihn löslich in Äthylalkohol, Schwefelkohlenstoff, Benzol und Aceton.

Der gelbe Farbstoff ist sehr lichtempfindlich; schon der gefärbte Filtrierpapierstreifen bleicht im zerstreuten Tageslicht nach einigen Tagen merklich. Sehr viel schneller bleichen jedoch die methyl- und äthylalkoholischen Lösungen; im zerstreuten Tageslicht bleichen diese Lösungen im Sommer in ein bis zwei Tagen vollständig. Aber auch im Dunkeln entfärben sich diese Lösungen allmählich; nach ein bis zwei Wochen ist vollständige Entfärbung eingetreten. Auch im Licht gewachsene Kulturen erscheinen schwächer gefärbt.

Die äthylalkoholische Lösung des gelben Farbstoffs absorbiert im sichtbaren Teil des Spektrums, beginnend im Blauen, vorwiegend im Violetten. Aber auch das langwellige Ultraviolett wird stark absorbiert. Für einige Wellenlängen des Cadmiumfunkens konnte die Absorption bis zur Wellenlänge 214,5 mμ beobachtet werden. Die alkoholische Lösung des gelben Farbstoffs zeigt keine Fluoreszenz, jedoch einen merklichen, wenn auch schwachen, Tyndallkegel. Eine Fluoreszenz konnte auch nicht beobachtet werden, wenn die alkoholische Lösung mit Wasser versetzt wurde.

Beim Eindunsten der äthylalkoholischen Lösung, auch in der Kälte, verbleibt ein ockerfarbener Rest, der sich aber nur teilweise mit Alkohol wieder aufnehmen läßt; auch zeigt der wieder gelöste Anteil nicht die gleiche Sättigung wie die ursprüngliche Lösung. Vielleicht besteht der Farbstoff aus mehreren Komponenten, die gar nicht oder nur locker aneinandergebunden sind. Wegen der äußerst geringen verfügbaren Menge dieses Farbstoffs konnte eine genauere chemische Untersuchung noch nicht erfolgen.

Ein fluoreszierender Stoff.

Neben dem gelben Farbstoff, der bei Stamm P auftrat, wurde bei beiden Stämmen noch ein anderer, als solcher wahrscheinlich farbloser, Stoff gefunden, der sich durch eine schöne himmelblaue Fluoreszenz auszeichnet, die an die des Äskulins erinnert. Dieser Stoff ist nicht mit dem gelben Farbstoff identisch, da Lösungen des letzteren nicht fluoreszieren, und da der fluoreszierende Stoff ja auch bei dem farblosen Stamm C beobachtet wurde. Der fluoreszierende Stoff befindet sich vorwiegend in der Lösung, teilt sich jedoch auch der Cellulosefaser mit. Er ist kochbeständig. Weder die frische unbeimpfte Cellulose-Mineral-Nährlösung zeigte die Spur einer Fluoreszenz, noch trat eine solche nach langem Stehen in dieser Nährlösung auf, so daß der fluoreszierende Stoff erst bei der Zersetzung der Cellulose entsteht. Allerdings beobachtet man eine bläuliche Fluoreszenz auch in Substraten mit Agar und Gelatine und in Nährlösungen mit organischen Substanzen (Bouillon), sowie in Kulturen anderer Mikroorganismen, so daß diese Fluoreszenz nicht streng spezifisch für die Kulturen des Cellulosezersetzers ist.

In der unbehandelten Lösung wird man den fluoreszierenden Stoff nicht immer deutlich beobachten können, da wegen der Schwebestoffe das Fluoreszenzlicht meist durch den Tyndalleffekt verhüllt wird. Bei Stamm C genügt jedoch Ultrafiltration durch ein Membranfilter. Bei Stamm P erhält man unter diesen Umständen eine grünliche Färbung, da die Lösung noch Spuren des gelben Farbstoffs enthält. Beim Kochen dieser Lösung wird jedoch mit dem ausfallenden Eiweiß und Calciumcarbonat (aus dem in der Lösung enthaltenen Calciumbicarbonat stammend) der Rest des gelben Farbstoffs mitgerissen, so daß man auch hier nach erfolgter Ultrafiltration dieselbe schöne blaue Fluoreszenz erhält wie bei Stamm C. Reste eines Tyndalleffektes kann man durch Beobachtung des Fluoreszenzlichtes durch einen Nikol unschädlich machen.

Die Fluoreszenz beginnt im äußersten Violett des erregenden Lichtes, was nach dem blauen Ton des Fluoreszenzlichtes ja zu erwarten ist, und wird noch deutlich hervorgerufen im nahen Ultraviolett bis 275 mμ. Die stärkste Fluoreszenz ist bei etwa 350 mμ zu beobachten; jedoch ist anzunehmen, daß auch Licht von kürzerer Wellenlänge als 275 mμ noch Fluoreszenz erregt, nur wird dieses Licht — in zunehmendem Maße nach den kürzeren Wellenlängen zu — von der Nährlösung selbst, die noch einen Teil der Mineralbestandteile der ursprünglichen Nährlösung enthält, absorbiert. Unmittelbar an der der Lichtquelle zugewandten Wand des Beobachtungsgefäßes (Quarzküvette) konnte auch bei 230 mμ noch ein ganz kurzer fluoreszierender Streifen beobachtet werden.

Es wurde weiterhin versucht, den fluoreszierenden Stoff aus der Lösung mit Äther, Benzol, Chloroform und Tetrachlorkohlenstoff auszuschütteln, jedoch ohne Erfolg. Nach der Behandlung war keine merkliche Abnahme der Fluoreszenz zu verzeichnen, nur war meistens der Tyndallkegel verstärkt.

Der Duftstoff.

Eingangs war bereits erwähnt worden, daß als Kriterium der Reinheit einer Kultur des Cellulosezersetzers ihr Geruch mitverwertet werden kann. Früher wurde meistens angegeben, daß die Kulturen dieses Organismus einen unangenehmen, ekelerregenden Geruch besitzen; an diesem sind Schwefelwasserstoff und wahrscheinlich auch Skatol und ähnliche Stoffe beteiligt. Der Schwefelwasserstoff ist durch Reduktion der zugesetzten Sulfate entstanden. Die reine Kultur verhält sich in dieser Beziehung nun gänzlich anders. Es wurde oben bereits bemerkt, daß in dieser eine Reduktion der Sulfate nicht erfolgt, so daß dafür in den früher untersuchten Kulturen Begleitorganismen verantwortlich gemacht werden müssen, die aller Wahrscheinlichkeit aus der zugesetzten Kreide stammten und sich über die unzureichenden Sterilisationsmaßnahmen hinweg am Leben zu erhalten vermochten. In den reinen Kulturen wird Schwefelwasserstoff also nicht gebildet, was

schon äußerlich daran zu erkennen ist, daß aus dem zugesetzten Ferrosulfat kein Schwefeleisen ausgefällt wird und eine Verfärbung der Kultur nicht eintritt.

Die reine Kultur des anaeroben Cellulosezersetzers hat nun keineswegs einen unangenehmen, sondern vielmehr einen aromatischen Geruch, der als durchaus angenehm zu bezeichnen ist. Obwohl es schwierig ist, die Geruchsqualität einigermaßen scharf festzulegen, möchte der Verfasser annehmen, daß der Geruch der Kultur etwa die Mitte hält zwischen dem von Weißwein und Ananas. Am Zustandekommen dieses Geruches ist sicher die geringe Menge Äthylalkohol, die bei der Cellulosezersetzung entsteht, ebenso vielleicht einige (höchstens in Spuren vorhandene) Ester, die aber nicht isoliert wurden, mitbeteiligt. Das eigentliche Prinzip ist aber ein in der Kulturflüssigkeit vorhandener besonderer Körper, der leicht nachgewiesen werden kann. Dieser läßt sich nämlich aus der Lösung mit Äther ausschütteln. Man erhält dann nach Eindunsten des Äthers (in der Kälte) einen dunkelbraunen Stoff mit ganz intensivem Geruch. Verfasser möchte diesen mit dem der Hyazinthe oder vielleicht noch besser mit dem der Blüte von *Robinia pseudacacia* vergleichen.

Dieser Duftstoff ist recht flüchtig; an der Luft geht der Geruch nach ein bis zwei Tagen verloren; es hinterbleibt aber noch ein geruchloser Rückstand. Daß es sich bei dem mit Äther ausgeschüttelten Stoff um wenigstens zwei Komponenten handelt, zeigt auch das mikroskopische Bild; man findet neben anisotrop kristallinen auch wachsartige Anteile, die in Äthylalkohol löslich sind. Wegen der sehr geringen zur Verfügung stehenden Mengen war durch Geruchsprobe nicht zu entscheiden, ob der kristalline oder der wachsartige Anteil der eigentliche Duftträger ist. Der Duftstoff geht auch mit Wasserdampf über.

Die aus den Kulturen der Stämme P und C gewonnenen Duftstoffe sind einander hinsichtlich der Geruchsqualitäten so ähnlich, daß sie als identisch bezeichnet werden müssen; vielleicht ist der Duftstoff des Stammes P etwas süßlicher als der des Stammes C. Auch in solchen Kulturen, die anstatt Ammonsulfat als Stickstoffquelle Asparagin, Kalium- oder Natriumnitrat erhalten hatten, war der gleiche Duftstoff nachzuweisen. Etwas verändert erschien der Geruch einer Kultur des Stammes P, die einen Zusatz von Vitamin D erhalten hatte. Hier war zwar auch ein aromatischer Geruch vorhanden wie in den anderen Kulturen, aber mit einem Unterton des brenzlichen. Bemerkenswert ist nun, daß sich die Kultur des Stammes P, deren Impfmaterial vorher mit der Quarzlampe bestrahlt wurde (vgl. S. 257), ganz ähnlich verhielt. Es ist durchaus möglich, daß auch in diesem Falle das Vitamin D für die Geruchsveränderung verantwortlich zu machen ist; denn es wäre denkbar, daß beim Impfmaterial durch die Bestrahlung aus etwa vor-

handenem Ergosterin dieses Vitamin gebildet worden ist. Es ist aber anzunehmen, daß auch in diesen Kulturen der Duftstoff unverändert vorhanden ist und daß sich ihm nur eine Komponente überlagert.

Es wurde noch versucht, den Duftstoff mit anderen organischen Lösungsmitteln auszuschütteln, z. B. mit Petroläther, Benzol und Chloroform. In Petroläther geht der Duftstoff nicht über, in Chloroform etwas. Das Chloroform ist aber zur Gewinnung des Duftstoffes nicht so gut geeignet, da es stark schäumt und der Schaum sehr beständig ist. Beim Ausschütteln mit Benzol erhält man beim Eindunsten ebenfalls eine bräunliche, aber geruchlose Masse. In schwach verunreinigten Kulturen bekommt man neben dem Duftstoff meist Stoffe mit skatolartigem Geruch.

Eingehendere Untersuchungen über den Duftstoff waren wegen der äußerst geringen zur Verfügung stehenden Mengen — Bruchteil eines Milligramms — nicht möglich. Er scheint aber für den anaeroben Cellulosezersetzer äußerst charakteristisch zu sein.

Zusammenfassung.

Es wird auf eine Fehlerquelle aufmerksam gemacht, die die Reinzüchtung des anaeroben Cellulosezersetzers in Frage stellen kann. Denn in der Kreide, die der Nährlösung zum Abfangen der bei der Gärung entstehenden Säuren zugesetzt wird, konnten neben anderen Keimen auch solche des anaeroben Cellulosezersetzers nachgewiesen werden, die sich über die üblichen Sterilisationsmaßnahmen hinweg am Leben zu erhalten vermögen. Es empfiehlt sich daher die Verwendung reinster Präparate des Calciumcarbonats und die Anwendung ausreichender Sterilisationsmaßnahmen, am besten Autoklavieren bei 130° C in mehreren Fraktionen mit eingeschalteter mehrtägiger Bebrütung und Evakuieren kurz vor dem Autoklavieren zur Entfernung etwa in dem Calciumcarbonat oder der Cellulose okkludierter Luft; die Anwesenheit solcher Luft genügt, um die Wirksamkeit der Sterilisation wesentlich herabzusetzen.

Auf Grund dieser Erfahrungen wurden zwei neue Stämme des anaeroben Cellulosezersetzers isoliert: ein farbloser Stamm und ein Stamm mit intensiver Farbstoffbildung. Es zeigte sich, daß das Wachstum dieser Stämme — insbesondere des gelben Stammes — in der verwendeten Nährlösung, die Cellulose als einzigen organischen Körper enthielt, mit der Anzahl der Weiterimpfungen nachläßt. Dieser Mangel kann behoben werden durch Zusatz von grünem Maiskeimblätterextrakt, der sich von den untersuchten Stoffen als am wirksamsten erwies. Auch das Vitamin D scheint eine günstige Wirkung zu haben.

Beim Abbau der Cellulose legen sich die Bakterien gerichtet der Cellulosefaser an, derart, daß die Längsrichtung der Stäbchen der

Richtung der fibrillären Struktur der Faser parallel ist. Es wird dies in Zusammenhang gebracht mit der Art des Celluloseabbaues. Das Fadenmolekül der Cellulose, dessen Länge von der gleichen Größenordnung wie die des Bakteriums ist, wird wahrscheinlich an bestimmten Stellen angegriffen, so daß schließlich — auch infolge der Lockerstruktur der Cellulosefaser — der Verband der Faser gesprengt wird; im mikroskopischen Bild findet man dann eigentümliche Korrosionsfiguren und Trümmer. Eine vorherige Verquellung der Faser findet nicht statt. Die Art dieses Abbaues der Cellulosefaser läßt sich nur durch die Annahme eines Endoenzyms deuten, da ein Abbau nur dort stattfindet, wo die Faser von Bakterien besetzt ist. Der weitere Abbau der Cellulose führt über einstweilen strittige Zwischenprodukte zu flüchtigen Säuren und Äthylalkohol, wobei ungefähr die Hälfte der Cellulose in diese Säuren zerfällt. Die flüchtigen Säuren bestehen in der Hauptsache aus Essigsäure und Buttersäure (letztere im Mittel 5 % der flüchtigen Säuren). Das weiterhin beobachtete Kohlendioxyd entstammt zum größten Teile oder ganz dem zur Neutralisation zugesetzten Calciumcarbonat, aus dem es durch die Säuren freigemacht wird. In geringer Menge, und nicht in allen Kulturen, entsteht Wasserstoff. Zu Beginn des Wachstums wird in der Kultur Sauerstoff verbraucht. Dieser wird wahrscheinlich für den ersten Eingriff in das Cellulosemolekül verwendet. Da aber wegen der Fadengestalt der Moleküle nur wenig Sauerstoff benötigt wird, um bereits tiefgreifende Veränderungen zu erzielen, verläuft der Vorgang des Celluloseabbaues bei diesem Bakterium im ganzen scheinbar anaerob.

Neben den genannten Stoffen wurden noch in beiden Stämmen ein bläulich fluoreszierender Stoff und ein Duftstoff nachgewiesen. Bei dem farbigen Stamm trat außerdem noch ein in Methyl- und Äthylalkohol leicht löslicher Farbstoff auf, der im Lichte leicht ausbleicht. In anderen Lösungsmitteln ist dieser Farbstoff nur wenig oder gar nicht löslich. Der gelbe Farbstoff ist in der Hauptsache an die Faser gebunden, die sich dichroitisch anfärbt, während der Duftstoff und der fluoreszierende Stoff sich in der Lösung befinden.

Literatur.

Bailey, A. J., The Paper Industry Year 1938, Nr. 2. — *Bailey, I. W.* u. *Vestal, M. R.*, J. Arnold Arboretum **18**, 196, 1937. — *Baker, F.*, Nature **143**, 522, 1939. — *Baker, F.* u. *Martin, R.*, (1) Zbl. Bakt. II, **96**, 18, 1937. — (2) Ebenda **97**, 201, 1937. — (3) Ebenda **99**, 400, 1939. — *Bernhauer, K.*, Gärungschemisches Praktikum. Berlin 1936. — *Bonner, I.*, Jahrb. wiss. Bot. **82**, 377, 1935. — *Bojarskaja, B. G.*, Microbiology **8**, 142, 1939.

Clausen, P., Zbl. Bakt. II, **84**, 377, 1931. — *Coolhaas, C.*, ebenda **76**, 38, 1929. — *Cowles, Ph. B.* u. *Rettger, L. F.*, J. Bact. **21**, 167, 1931.

Farr, W. K. u. *Eckerson, S. H.*, Contr. Boyce Thompson Inst. **6**, 309, 1934. — *Frey-Wissling, A.*, (1) Protoplasma **25**, 261, 1936. — (2) Ebenda **27**, 372, 1937. — (3) Naturwiss. **28**, 385, 1940.

Hooper, F. E., Contr. Boyce Thompson Inst. **10**, 267, 1939.

Imšenecki, A. A., (1) C. R. de l'Ac. Sc. de l'URSS. **21**, 332, 1938. — (2) Microbiology **8**, 129, 1939. — (3) Ebenda **8**, 353, 1939. — (4) Ebenda **9**, 233, 1940. — (5) Ebenda **9**, 433, 1940. — (6) Ebenda **10**, 385, 1941. — *Imšenecki, A. A.* u. *Bojarskaja, B. G.*, ebenda **8**, 657, 1939.

Kellerman, K. F. u. *Mc Beth, I. G.*, Zbl. Bakt. II, **34**, 485, 1912. — *Khouvine, Y.*, (1) Ann. Inst. Pasteur **37**, 711, 1923. — (2) Cellulose et Bactéries, Décompos. et Synthèse, Paris 1934. — *Khouvine, Y.* u. *Soeters, K.*, C. R. Soc. Biol. **122**, 59, 1936.

Löhnis, F. u. *Lochhead, G.*, Zbl. Bakt. II, **37**, 490, 1913.

Meyer, K. H. u. *van der Wyk, A. J. A.*, Zeitschr. f. Elektrochem. **47**, 353, 1941. — *Meyer, R.*, (1) diese Zeitschr. **5**, 185, 1934. — (2) Forschungsdienst **5**, 197, 1938. — (3) Diese Zeitschr. **9**, 80, 1938. — *Meyer, V.*, Zbl. Bakt. II, **92**, 1, 1935. — *Müller, F.*, Helv. chim. Acta **22**, 208, 1939.

Omelianski, W., Zbl. Bakt. II, **8**, 193, 1902.

Pfenniger, L. u. *Frey-Wissling, A.*, Protoplasma **23**, 371, 1939. — *Pochon, J.*, (1) Ann. Inst. Pasteur **55**, 676, 1935. — (2) C. R. Soc. Biol. **127**, 999, 1938. — *Pringsheim, H.*, (1) Zbl. Bakt. II, **23**, 300, 1909. — (2) Ebenda **38**, 513, 1913.

Rotmistrov, M. N., (1) Microbiology **8**, 56, 1939. — (2) Ebenda **9**, 331, 1940. — (3) Ebenda **9**, 453, 1940. — *Rotmistrov, M. N.* u. *Scharojko, K. M.*, Microbiology **8**, 806, 1939. — *Rotmistrov, M. N.* u. *Sherbakova, J. A.*, Microbiology **10**, 49, 1941. — *Rouschal, E.* u. *Strugger, S.*, Ber. dtsch. bot. Ges. **58**, 50, 1940. — *Ruska, H.*, Kolloid-Zeitschr. **92**, 276, 1940.

Schulze, P., Zeitschr. VDI. **83**, 1306, 1939. — *Seifriz, W.*, Ind. engin. Chem. **28**, 136, 1936. — *Śnieszko, St.*, (1) Zbl. Bakt. II, **78**, 375, 1929. — (2) Ebenda **88**, 403, 1933. — *Staudinger, H.*, Naturwiss. **28**, 136, 1936. — *Strugger, S.*, (1) Flora (Jena) **132**, 253, 1938. — (2) Ebenda **133**, 56, 1938. — (3) Biol. Zbl. **59**, 409, 1939. — (4) Zeitschr. f. Bot. **35**, 97, 1939/40.

Tetrault, P. A., Zbl. Bakt. II, **81**, 28, 1930. — *Tscheltzowa, Ju. S.*, Microbiology **8**, 481, 1939.

Werner, E., Zbl. Bakt. II, **67**, 297, 1926.

Weitere Literatur über anaerobe Cellulosezersetzung siehe bei *R. Meyer*, Forschungsdienst **5**, 197, 1938.

(Aus dem Botanisch-Mikrobiologischen Institut der Technischen Hochschule Karlsruhe.)

Mikrobiologische Untersuchungen an See- und Süßwasserfischen.

V. Mitteilung:

Über die Wirkung von ultraviolettem Licht auf den Oberflächenkeimgehalt von Fischfilets und von Fischen[1].

Von

Th. Zeiser und **W. Schwartz.**

Mit 5 Textabbildungen.

(Eingegangen am 22. Februar 1943.)

Die bakterizide Wirkung von ultraviolettem Licht bestimmter Wellenlängen ist bekannt und schon wiederholt bei der Lebensmittelkonservierung angewandt worden. Meist wird das UV-Licht mit einem anderen Konservierungs- oder Frischhaltungsverfahren kombiniert, etwa mit der Anwendung von Kälte. Die äußerst geringe Eindringungstiefe beschränkt den Anwendungsbereich von vornherein auf die Fälle, in denen bei festen Körpern, wie Fisch oder Fleisch, die Bakterien nur die Oberfläche infiziert haben, oder in denen Flüssigkeiten, wie Milch, in dünner Schicht an den UV-Lampen vorbeigeführt werden können.

Bei Seefischen wäre vor allem daran zu denken, Filets, die durch Tiefgefrieren für Monate haltbar gemacht werden sollen, einer UV-Vorbehandlung zu unterwerfen, um die mit dem Schlachten und Filetieren verbundene Oberflächeninfektion möglichst wieder auszuschalten. Voraussetzung für die Wirksamkeit dieses Verfahrens ist die Annahme, daß die Abtötung der Bakterien mit einer Vernichtung der von ihnen hervorgebrachten Enzyme verbunden ist, so daß die Filets in einem biologisch günstigeren Zustand zur Gefrierbehandlung und anschließenden Lagerung gelangen.

Die 16 in dieser Veröffentlichung besprochenen Versuchsserien wurden 1940 mit verhältnismäßig frischen Seefischfilets ausgeführt, die uns in Eis verpackt unmittelbar von der Küste aus zugeschickt wurden. Äußere Gründe zwangen zu einer längeren Unterbrechung der Arbeit. Bei der Wiederaufnahme 1942 zeigten von 14 Versuchen mit 8 UV-Röhren nur 2

---

[1] Ausgeführt mit Unterstützung des Reichsforschungsrates und des Reichskuratoriums für Technik in der Landwirtschaft. Die Versuchsapparatur wurde mit Unterstützung der Siemens-Schuckert-Werke A.-G. in Berlin-Siemensstadt entwickelt.

eine mit den früheren Ergebnissen vergleichbare starke Abtötung; im Mittel aller Keimzahllogarithmen war die Abtötung sogar schwächer als 1940 mit nur 2 UV-Röhren[1].

Die Unvereinbarkeit der Ergebnisse ist offenbar durch Unterschiede im Versuchsmaterial bedingt. Die Filets von 1942 waren größtenteils Gefrierfilets, die uns teils noch leicht gefroren, teils schon aufgetaut zur Verfügung standen, — also ein Material, bei dem zweifellos schon eine stärkere, der UV-Wirkung entzogene Tiefeninfektion anzunehmen war.

Da frische Filets nicht erhältlich waren, haben wir uns in der Auswertung auf die Versuche von 1940 beschränkt, weil nur dort ein Vergleich verschiedener Bestrahlungsstärken möglich war. Allerdings mußten wir dabei in Kauf nehmen, daß wegen der geringen Versuchszahl (insgesamt 16 Reihen) die Auswertung vorläufigen Charakter hat und nur mit Vorbehalt einer späteren Nachprüfung veröffentlicht werden kann.

Für die praktische Anwendung der UV-Behandlung ergibt sich jedoch schon jetzt die wichtige Konsequenz, daß ihr Erfolg völlig von der Beschaffenheit des Ausgangsmaterials abhängig ist.

In einigen Versuchen wurde auch die UV-Wirkung auf den Oberflächenkeimgehalt ganzer Fische geprüft.

Auf die Theorie der UV-Wirkung, insbesondere auf die Frage nach dem Nebeneinander direkter und indirekter Wirkungen, soll hier nicht eingegangen werden. Sie wird in einem anderen Zusammenhang behandelt werden.

I. Methode.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten der UV-Bestrahlung. Mit Rücksicht auf die in der Praxis angestrebte Verwendung wählten wir (abgesehen von einigen orientierenden Versuchen mit wiederholter Bestrahlung ganzer Fische) die einmalige, möglichst kurzfristige Bestrahlung von der Küste bezogener frischer Fischfilets bei möglichst kleinem Abstand der UV-Lampen.

Die UV-Lampen waren röhrenförmige Quecksilberdampf-Niederdrucklampen, Type HNS 1350/0,5 m, mit einem Durchmesser von etwa 1,4 cm und einer Leuchtlänge von 30 cm. Von der Gesamtstrahlung entfallen 85% auf die Linie 2537 Å, der Rest größtenteils auf die Linie 1849 Å. Als Versuchsmaterial dienten Kabeljau- und Schellfischfilets, Heringe, Schleien, Brachsen und Rotfedern.

Versuche mit Fischfilets. Die aus der Bauchseite (Innenseite) eines großen Filetlappens herausgeschnittenen Versuchsstücke (Größe etwa 4 : 5 cm) lagen in einer bestimmten Anordnung in ein oder zwei Reihen auf einer Glasplatte im Impfkasten. Die Bestrahlungsanlage war 10 cm über der Filetoberfläche eingebaut. Sie bestand zunächst aus 2, dann aus 4 und schließlich aus 8 UV-Lampen, deren Abstand voneinander 20, 8,3 bzw. 4 cm betrug. Die senkrecht unter den Röhren liegende bestrahlte Fläche umfaßte 20×30, 25×30 bzw. 28×30 cm.

Bei den Filets wurde der Oberflächenkeimgehalt vor Versuchsbeginn bestimmt, sowie 20 oder 30 und 40 Sekunden und 1, 2, 5, 10, 20 und 30 Minuten nach Versuchsbeginn.

[1] Eine Intensitätsmessung ergab, daß die Röhren in ihrer Wirksamkeit nicht nachgelassen hatten.

Versuche mit ganzen Fischen. Bei einmaliger UV-Behandlung (nur ein Versuch) war die Anordnung die gleiche wie bei den Filetversuchen. Bei mehrmaliger Bestrahlung lagen die Fische in den früher beschriebenen Glaswannen (*Schwartz* und *Zeiser*, 1939) im Kühlschrank in 20 cm Abstand von den beiden UV-Lampen. Der Deckel der Glaswannen wurde während der Behandlungsdauer von 10 bis 30 Minuten und während der folgenden 10 bis 15 Minuten abgenommen. Die Kühlschranktemperatur war + 6° C.

Um bei der anschließenden Kühllagerung einen zuverlässigen Maßstab für das Erreichen der Haltbarkeitsgrenze zu haben, wurde die Kurve der Oberflächenkeimzahl-Logarithmen ergänzt durch die Qualitätskurve, die auf Grund der subjektiven Qualitätskontrolle (*Zeiser* und *Schwartz*, 1942) aufgestellt war.

Die Keimzahlberechnung erfolgte nach der früher beschriebenen Methode: Entnahme von 5 oder 10 qcm Fischhaut von den ganzen Fischen bzw. einer entsprechenden etwa 2 bis 5 mm dicken Gewebescheibe von der Filetoberfläche; Herstellung der Aufschwemmung mit abgekochtem, sterilem Leitungswasser, Aussaat in Fleischbouillongelatine, Berechnung der Keimzahl je qcm Fisch- bzw. Filetoberfläche.

Wie bei früheren Versuchen wurde jede Fischbouillongelatineplatte mindestens zweimal gezählt, vorläufig am zweiten Tag, endgültig am dritten oder einem späteren Tag.

Manche Versuche ließen vermuten, daß nach einer Bestrahlungsdauer bis 5 Minuten der Keimzahlanstieg von der ersten zur zweiten Zählung größer sei als nach einer längeren Bestrahlungsdauer. Dies würde bedeuten, daß überlebende Keime im ersten Falle eine Verzögerung ihres Wachstums aufweisen. Das Mittel der Keimzahlanstiege war jedoch für alle Versuche von 0 Sekunden bis 30 Minuten gleich; nicht abgetötete Keime werden also durch die vorhergegangene Bestrahlung nicht gehemmt. Die UV-Wirkung hat also auch hiernach den Charakter einer Trefferwirkung: entweder wird die Zelle getötet oder sie bleibt, was die unmittelbare UV-Wirkung anbetrifft, unbeeinflußt.

II. Versuchsergebnisse.

1. Kühllagerung ganzer Fische bei wiederholter UV-Behandlung.

Vier Versuchsreihen mit Heringen, Schleien, Brachsen, Rotfedern verliefen in bezug auf die UV-Wirkung ziemlich gleich, so daß als Beispiel nur ein Versuch mit 14 Heringen herausgegriffen werden soll (Abb. 1), von denen 8 mit UV bestrahlt wurden und 6 als Kontrolle dienten.

Bei Versuchsbeginn hatten zwei unbehandelte Fische je qcm 6,3 und $3{,}48 \times 10^4$ Keime. Das Mittel der Keimzahllogarithmen war also 4,67. Zwei UV-bestrahlte Fische ergaben $2{,}1 \times 10^3$ und $1{,}5 \times 10^4$ Keime und log 3,74. Der Keimzahllogarithmus war also durch die Bestrahlung um 0,93, die Keimzahl auf rund 12% des Anfangswertes gesenkt.

Nach 2 Tagen hatte eine Probe von den bei Versuchsbeginn bestrahlten Fischen einen mittleren Keimzahllogarithmus von 5,83, der durch erneute Bestrahlung auf 5,06 fiel, also um 0,77, was einer Senkung der Keimzahl auf 17 % entspricht.

Am fünften Versuchstag wurde zunächst bei unbehandelten Fischen ein mittlerer Keimzahllogarithmus von 9,21 festgestellt. Die bereits zweimal, am nullten und zweiten Tag bestrahlten Fische ergaben nur 7,96, also eine Senkung um 0,42 oder auf 38 %.

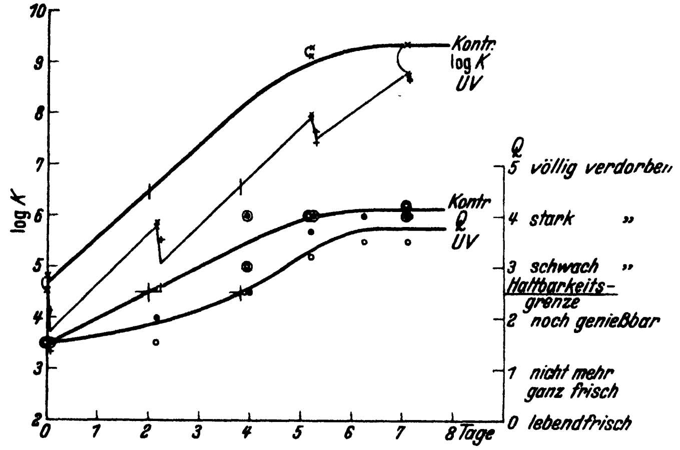


Abb. 1. Kühllagerung grüner Heringe bei + 6° C mit wiederholter UV-Bestrahlung. Abszisse: Tage. Ordinate: Obere Kurven: log der Keimzahlen je qcm Oberfläche bei der Kontrolle und nach Bestrahlung. Untere Kurven: Qualitätskurven für Kontrollreihe und UV-Reihe; Aussehen und Geruch: ◎ ⊙ = Kontrollreihe, ○ ● = UV-Reihe.

Am siebenten Tag ergaben die Kontrollfische 9,07, die nun schon dreimal (am nullten, zweiten und fünften Tag) bestrahlten UV-Fische 8,79 und nach erneuter Bestrahlung 8,76, also eine Senkung um 0,12 oder auf 76 %.

Überblicken wir den Kurvenverlauf und die Prozentzahlen, so wird deutlich, daß die UV-Wirkung im Laufe des Versuchs immer mehr abnimmt. Es werden verhältnismäßig immer weniger Keime abgetötet. Da keine UV-Versuche mit nichtbestrahlten Fischen höherer Anfangskeimzahlen vorliegen, kann nicht entschieden werden, ob dies auf einem Übrigbleiben relativ UV-resistenter Stämme beruht.

Auf Grund der Beschreibungen des Zustandes der Fische (Geruch, Aussehen, Schleimbildung usw.) in den Versuchsprotokollen wurde die Qualitätskurve zur Veranschaulichung des Frischezustandes und des allmählichen Verderbens ermittelt. Hiernach erreichten bei dieser Serie die Kontrollfische die Haltbarkeitsgrenze ($Q = 2{,}5$) nach 2, die bestrahlten nach 3,8 Tagen.

Dagegen wurde bei einer Serie mit Brachsen und Rotfedern die Haltbarkeitsgrenze von beiden Gruppen gleichzeitig, ja von den Bestrahlten eher etwas früher erreicht. Bei einer weiteren Serie standen keine Kontrollfische zur Verfügung, und die vierte mußte aus äußeren Gründen vorzeitig abgebrochen werden.

Die Behandlung mit nur zwei UV-Strahlern hat bei ganzen Fischen keine einwandfreie, praktisch bedeutsame Verlängerung der Haltbarkeit ergeben. Nach den Ergebnissen der Filetversuche dürfte aber Aussicht bestehen, durch Steigerung der Strahlungsintensität bessere Erfolge zu erzielen.

2. Versuche mit Fischfilets und ganzen Fischen bei einmaliger UV-Behandlung.

a) Versuche mit 2, 4 und 8 UV-Röhren.

Um Zufälligkeiten der Einzelwerte auszuschalten, die wohl hauptsächlich auf die ungleichmäßige Keimverteilung auf der Filetoberfläche (*Zeiser*, 1943) zurückzuführen sind, und einen Überblick über die Gesetzmäßigkeiten des Kurvenverlaufs zu erhalten, wurde für jede der Probezeiten von 0 bis 30 Minuten das Mittel aus den Keimzahllogarithmen-Senkungen der Einzelserien gebildet, so daß sich Durchschnittskurven ergaben (Tabelle I, Abb. 2). Wir haben das Mittel aus den Logarithmen und nicht aus den Keimzahlen selbst gewählt, da die Verkürzung der Haltbarkeitsdauer proportional der Zunahme des Logarithmus ist (*Schwartz* und *Zeiser*, 1939).

Tabelle I. Keimzahlsenkung auf der Oberfläche UV-bestrahlter Fischfilets (Durchschnittswerte).

	Restliche Keimzahl je qcm Oberfläche in % der Anfangskeimzahl nach einer Bestrahlungsdauer von								
	20 Sek.	30 Sek.	40 Sek.	1 Min.	2 Min.	5 Min.	10 Min.	20 Min.	30 Min.
2 UV-Röhren	70	59	52	41	27	22	21	32	30
4 UV-Röhren	26	21	16	26	14	10	11	12	13
8 UV-Röhren	24	8,5	4,7	2,9	3,1	2,1	3,5	6,6	2,6

Bei zehn Serien mit zwei UV-Lampen zeigt sich ein deutliches Absinken des Keimzahllogarithmus vom Anfangswert bis zur zweiten Minute und ein weiteres, schwaches Sinken bis zur fünften Minute. Bis zur zehnten Minute bleibt dann die Keimzahl nahezu konstant, um hierauf bis zur 20. Minute leicht zu steigen und bis zur 30 Minute wieder konstant zu bleiben.

Bis zur 40. Sekunde ist (Tabelle II) der Keimzahllogarithmus um 0,28, die Keimzahl also auf rund 52 % des Anfangswertes gesunken, nach 5 Minuten um 0,66, das entspricht einer Abnahme auf 42 % des Wertes

bei 40 Sekunden. Die Wirkung einer einzelnen Röhre erhalten wir, indem wir den Logarithmus der Gesamtsenkung durch die Röhrenzahl dividieren. Eine Röhre senkt also in 40 Sekunden den Logarithmus um

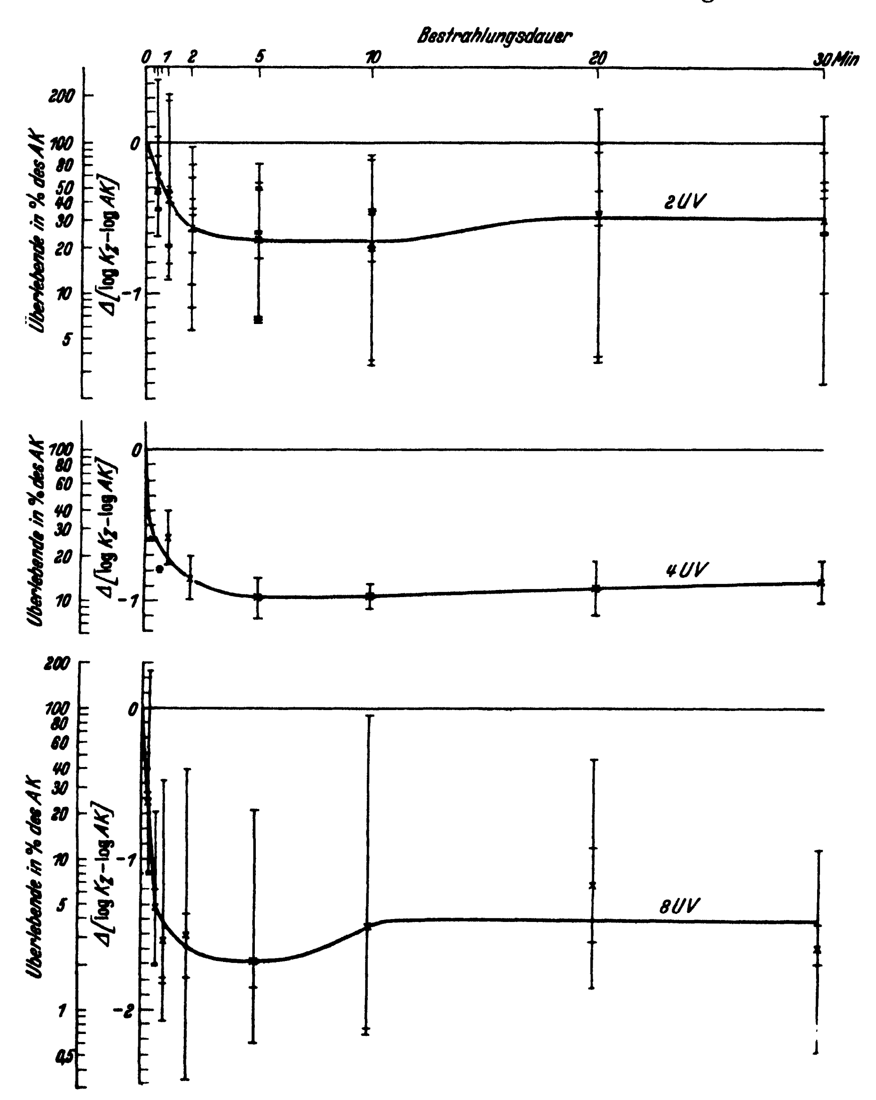


Abb. 2. Einmalige UV-Bestrahlung von Seefischfilets mit 2, 4, 8 UV-Röhren. Die einzelnen Versuchswerte sind angegeben. Abszisse: Dauer der Bestrahlung. Ordinate: Senkung des Keimzahllogarithmus je qcm Oberfläche Δ ($\log K_z - \log AK$)[1]. Überlebende Keime in % der Anfangskeimzahl.

[1] $\log K_z$ bedeutet den log der Keimzahl nach der jeweiligen Bestrahlungsdauer, $\log AK$ den log des Anfangskeimgehaltes.

0,14, die Keimzahl auf 72 %, in 5 Minuten um 0,33 auf 47 %. Für eine Verlängerung der Haltbarkeit ist eine solche Keimzahlsenkung noch viel zu gering.

Tabelle II. Anfangskeimzahllogarithmus (log AK), Senkung des Keimzahllogarithmus, (Δ log) und restliche Keimzahl in % der Anfangskeimzahl auf Grund der einzelnen Versuchswerte nach einer UV-Bestrahlung von 40 Sekunden, 5 und 30 Minuten. Die Mittelwerte der %-Zahlen wurden aus den Mittelwerten für Δ log berechnet (vgl. hierzu S. 282), nicht aus den einzelnen darüberstehenden %-Werten. Schlägt man den zweiten Weg ein, so ergeben sich Abweichungen, weil das Mittel zweier Zahlen stets größer ist als der Numerus des Mittels der Logarithmen.

	Serie	log AK	Nach 40 Sek.		Nach 5 Min.		Nach 30 Min.	
			Δ log *	% **	Δ log	%	Δ log	%
2 UV-Röhren	1	5,38	0,41	39	0,30	50	0,60	25
	2	5,20	0,11	78	0,32	48	0,37	43
	3	6,78	0,49	32	1,19	6,5	1,60	2,5
	4	6,20	0,23	59	0,14	72	0,07	85
	5	6,62	0,19	65	0,61	25	0,32	48
	6	7,06	0,28	52	1,16	6,9	0,27	54
	7	5,76	+0,39	246	0,27	54	+0,17	150
	8	6,26	0,33	47	0,59	26	0,61	25
	9	8,84	0,52	30	0,77	17	0,61	25
	10	6,18	0,64	23	1,18	6,6	1,00	10
Mittel der log- und der %-Werte		6,23	0,28	52	0,66	22	0,53	30
4 UV-Röhren	1	7,10	0,81	15	0,85	14	1,02	9,5
	2	7,06	0,77	17	1,12	7,6	0,74	18
Mittel der log- und der %-Werte		7,08	0,79	16	0,98	10	0,88	13
8 UV-Röhren	1	7,14	1,71	1,9	2,23	0,6	1,69	2,0
	2	7,03	1,70	2,0	1,86	1,4	1,43	3,7
	3	6,88	1,21	6,2	1,98	1,0	2,28	0,5
	4	6,03	0,69	20	0,68	21	0,93	12
Mittel der log- und der %-Werte		6,77	1,33	4,7	1,69	2,1	1,58	2,6

* Bei Δ log ist in der Tabelle das Minuszeichen bei Keimzahlsenkungen weggelassen. Ein Größerwerden des log ist durch Pluszeichen hervorgehoben. — ** Werte oberhalb 10 % sind auf Ganze, Werte darunter auf Zehntel abgerundet.

Außer den Zufallsschwankungen sind auch starke Abweichungen in den Abtötungsergebnissen im Verlauf der Einzelkurven zu verzeichnen. So zeigt z. B. die dritte Serie eine sehr starke Abtötung in 40 Sekunden auf 32 und in 5 Minuten auf 6,5 %; die zehnte auf 23 bzw. 6,6 %. Bei der mit dem gleichen Material ausgeführten vierten Serie dagegen ist nach 40 Sekunden die Keimzahl nur bis 59 % gesunken, steigt bis 5 Minuten wieder auf 72 %, bleibt etwa auf dieser Höhe und hat nach

30 Minuten 85 % erreicht. Es handelt sich hier nicht um isolierte Zufallswerte, sondern um Werte, die im Verlauf der Einzelkurven liegen. Die abweichenden Werte von 7 dagegen sind Zufallsergebnisse; sie kommen dadurch zustande, daß der Wert für die Anfangskeimzahl offenbar infolge der ungleichmäßigen Keimverteilung zu tief liegt, während der Kurvenverlauf eine gute Abtötung vermuten läßt.

Ein in gleicher Weise durchgeführter Versuch mit ganzen Fischen (Blaufelchen), der anhangsweise erwähnt sei, brachte ähnliche Ergebnisse; die stärkste Senkung um 1,21 auf 6,2 % war nach 10 Minuten erreicht. Gegen Ende des Versuchs kam es auch hier zu einem leichten Anstieg der Keimzahlen.

Bei Verwendung von vier UV-Röhren (zwei Serien) erhalten wir einen ähnlichen Kurvenverlauf und als Erfolg nach 40 Sekunden eine Senkung um 0,79 auf etwa 16 % der ursprünglichen Keimzahl, nach 5 Minuten um 0,98 auf 10,4 % – also von 40 Sekunden bis 5 Minuten um 0,19 auf 64 % des Wertes bei 40 Sekunden. Für eine Röhre beträgt die Senkung in 40 Sekunden 0,20 oder 63 % und in 5 Minuten 0,25 oder 56 % (Tabelle II).

Eine viel stärkere Keimzahlsenkung ist mit acht UV-Röhren (vier Serien) erreichbar. Nach 40 Sekunden ist der Keimzahllogarithmus schon um 1,33, die Keimzahl also auf nur 4,7 % gesunken, nach 5 Minuten um 1,69 auf 2,05 %; von 40 Sekunden bis 5 Minuten demnach um 0,36, auf 44 % des Wertes bei 40 Sekunden. Eine Röhre senkt den Logarithmus in 40 Sekunden um 0,17 und die Keimzahl auf 68 %, in 5 Minuten um 0,21 auf 62 % (Tabelle II).

Die vierte Serie mit der tiefsten Anfangskeimzahl ergab eine auffallend schwache Senkung (40 Sekunden 20,4 %, 5 Minuten 21 %) und verlief sehr unregelmäßig; die erste mit der höchsten Anfangskeimzahl brachte in regelmäßigem Kurvenverlauf die stärksten Senkungen auf 1,9 % schon nach 40 Sekunden und auf 0,59 % nach 5 Minuten. Bemerkenswert ist noch, daß die dritte Serie, die mit demselben Filetmaterial und am selben Tag wie die vierte angesetzt wurde, mit viel höherem Anfangswert beginnend, in regelmäßigem Kurvenverlauf zu bedeutend tieferen Endwerten sank als die vierte. Vermutlich hatte die dritte Serie eine stärkere Oberflächeninfektion, was sowohl die höhere Anfangskeimzahl als auch die stärkere Abtötung erklären würde, während bei der vierten Serie eine stärkere Tiefeninfektion anzunehmen ist.

Bei so ausgeprägten Keimzahlsenkungen, wie sie sich mit acht UV-Röhren erreichen lassen und wie sie bei weiterer Steigerung der Röhrenzahl zu erwarten sind, wäre eine günstige Nachwirkung bei der anschließenden Lagerung im tiefgefrorenen Zustand möglich. Erfahrungen an Fischen mit künstlich gesenkter Anfangskeimzahl

(*Schwartz* und *Zeiser*, 1939) mahnen aber auch hier zur Vorsicht[1] und verlangen eine experimentelle Prüfung in monatelang fortgesetzten genau kontrollierten Lagerungsversuchen.

Überblickt man die Ergebnisse (Abb. 2), so wird der übereinstimmende Verlauf ersichtlich: stärkste Senkung in den ersten 40 bis 60 Sekunden, dann schwächeres weiteres Sinken bis zum Minimum bei etwa 5 Minuten und schließlich ein mehr oder weniger deutlicher Wiederanstieg, dem bei acht UV-Röhren nochmals eine Senkung folgt.

Was den Kurvenverlauf jenseits der 5-Minuten-Grenze, Anstieg und erneutes Absinken bestimmt, ist noch unbekannt.

Zunächst sollte der Anstieg der Keimzahlen damit erklärt werden, daß sich die Bearbeitung der Proben bei Versuchsbeginn wegen der schnellen Aufeinanderfolge etwas verzögerte. In der längeren Pause zwischen Bestrahlen und Einbringen in den Kolben mit Verdünnungswasser hätte durch bei der Bestrahlung gebildete Giftstoffe eine zusätzliche Abtötung erfolgen können, deren Unterbleiben bei pausenloser Verarbeitung den Anstieg erklärt hätte. Es zeigte sich jedoch, daß es auch dann zum Anstieg der Keimzahlen kam, wenn stets zwischen Bestrahlung und Verdünnung eine Pause von 5 oder 10 Minuten eingelegt wurde.

Andere Erklärungsmöglichkeiten könnten darin liegen, daß bei unserer Versuchsanordnung die letzten Probestücke etwas mehr außen lagen und daher etwas schwächer bestrahlt wurden (daß sie eine viel größere Gesamtstrahlung empfangen, kann, wie wir später sehen werden, nicht als Gegenargument dienen), oder auch darin, daß die ersten Probestücke vom vorderen, die letzten dagegen vom hinteren, dünneren Filetende stammen, dessen Keimgehalt im Durchschnitt etwas höher ist (*Zeiser*, 1943).

Der Keimzahlanstieg bei den UV-Serien scheint uns zu ausgeprägt und zu regelmäßig zu sein, als daß er nur versuchstechnisch bedingt sein könnte[2].

Diese und andere Fragen der UV-Wirkung bedürfen jedenfalls einer gesonderten Bearbeitung unter vereinfachten und übersichtlicheren Versuchsbedingungen.

b) Beziehungen zwischen Anfangskeimzahl und Keimzahlsenkung sowie Wiederanstieg der Keimzahlen.

Verfolgt man die Beziehungen zwischen der Anfangskeimzahl der Filetoberfläche (log AK) und der durch UV erzielten Keimzahllogarithmen-Senkung, so ergibt sich, daß mit steigender Anfangs-

[1] So war beispielsweise bei frischen Fischen trotz Senkung der Anfangskeimzahl auf 0,3% die Haltbarkeit statt um die erwarteten 8 Tage kaum merklich verlängert. — [2] Für die Praxis ist der erneute Anstieg schon deshalb bedeutungslos, weil er erst nach 5 Minuten einsetzt.

keimzahl auch die Senkung des Keimzahllogarithmus zunimmt. Bei höherer Anfangskeimzahl werden nicht nur absolut, sondern auch relativ mehr Keime abgetötet. Für die Versuche mit zwei UV-Röhren ist diese Beziehung ziemlich klar zu erkennen; bei Verwendung von acht UV-Röhren ist sie wahrscheinlich, aber wegen der geringen Zahl der Versuchsserien noch nicht einwandfrei nachgewiesen (Abb. 3).

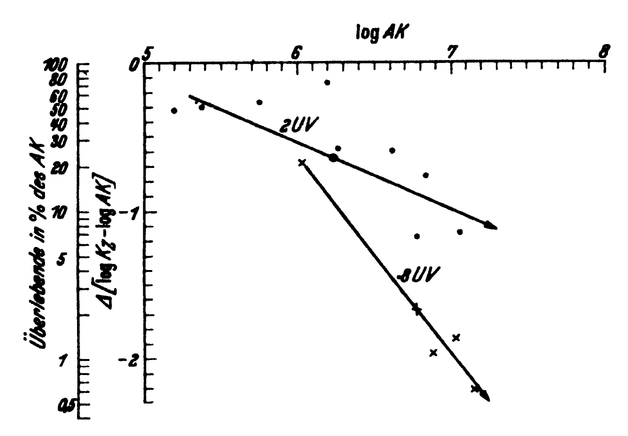


Abb. 3. Senkung des Keimzahllogarithmus nach einer Bestrahlungsdauer von 5 Minuten (Ordinate) in Abhängigkeit vom log der Anfangskeimzahl (Abszisse).

Bei größerer Keimdichte steigt die Trefferwahrscheinlichkeit für die Lichtquanten, es wären also wohl absolut, aber nicht relativ mehr Abtötungen zu erwarten. Über die Ursachen der verstärkten Abtötung sind vorerst nur Vermutungen möglich. Denkbar wäre ein Zusammenhang mit den Vorgängen bei der Tiefeninfektion. Vermehren sich, was aber bei ganzen Fischen im allgemeinen nicht der Fall zu sein scheint (*Schwartz* und *Zeiser*, 1939), die Oberflächenkeime stärker als die in die obersten Gewebeschichten eingedrungenen und dort der UV-Wirkung entzogenen Keime, dann müßte mit steigender Gesamtkeimzahl ein immer größerer Anteil der UV-Wirkung zugänglich sein und abgetötet werden.

Ferner könnten die bei der Abtötung entstehenden Zerfallsprodukte eine Giftwirkung ausüben und zu einer zusätzlichen Abtötung von Keimen führen, die durch die unmittelbare UV-Wirkung noch nicht erfaßt wurden. Diese zusätzliche Wirkung müßte um so größer sein, je näher die Keime beisammen liegen, je größer also die Keimzahl ist.

Für den Wiederanstieg der Keimzahllogarithmen in der Zeit zwischen 5 und 30 Minuten erhält man eine ganz ähnliche Kurve wie für die Senkung; auch er nimmt mit steigender Anfangskeimzahl zu.

c) Beziehung zwischen Röhrenzahl, Bestrahlungsdauer und Keimzahlsenkung. Wirkungsgrad der zur Bestrahlung aufgewendeten Energie.

An Hand der in Abschnitt 2a mitgeteilten Ergebnisse können wir uns die Beziehungen zwischen der Senkung des Keimzahllogarithmus und den dabei mitwirkenden Faktoren Röhrenzahl und Bestrahlungsdauer in den drei Versuchsabschnitten klarmachen. Hieraus lassen sich dann Schlüsse ziehen auf das Verhältnis zwischen der aufgewendeten Energie und dem erzielten Erfolg, also auf den Wirkungsgrad der UV-Behandlung.

Die Werte für die Senkung des Keimzahllogarithmus durch zwei, vier und acht UV-Röhren im ersten Versuchsabschnitt von 0 bis

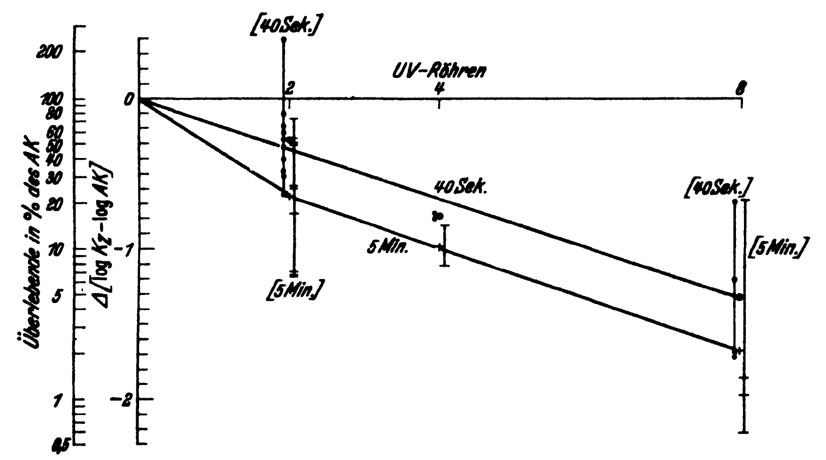


Abb. 4. Senkung des Keimzahllogarithmus für eine Bestrahlungszeit von 40 Sekunden und 5 Minuten in Abhängigkeit von der Röhrenzahl. Ordinate: Δ (log K_z — log AK). Abszisse: Röhrenzahl.

40 Sekunden liegen ziemlich genau auf einer durch den Nullpunkt gehenden Geraden (Abb. 4)[1]. In diesem Abschnitt steigt also die logarithmische Gesamtabtötung proportional zur Röhrenzahl, die Abtötung pro Röhre ist konstant: jede weitere Röhre senkt den Keimzahllogarithmus um etwa $\log K = 0{,}17$, die noch vorhandene Keimzahl auf 72%.

Die Werte für die Senkung bis 5 Minuten liegen auf einer parallelen Geraden. Im zweiten Abschnitt von 40 Sekunden bis 5 Minuten ist also die logarithmische Gesamtabtötung konstant und nicht mehr

[1] Die Versuche mit vier UV-Röhren hatten eine höhere, die mit 2 UV-Röhren eine tiefere Anfangskeimzahl als die Versuche mit acht Röhren (vgl. Abb. 2); nach Abschnitt 2b sind also die Keimzahllogarithmen-Senkungen zu groß bzw. zu klein. Wird dieser Umstand berücksichtigt, so dürften sich die Punkte eher noch der Geraden nähern.

proportional der Röhrenzahl; sie beträgt etwa $\log K = 0{,}64$, was einer Senkung auf 44 % der Keimzahl bei 40 Sekunden, unabhängig von der Röhrenzahl, entspricht. Die logarithmische Abtötung je Röhre sinkt demnach mit wachsender Röhrenzahl. Im dritten Abschnitt von 5 bis 30 Minuten schließlich tritt überhaupt keine Abtötung mehr ein, die entsprechende Gerade für 30 Minuten würde also mit der für 5 Minuten zusammenfallen, oder sogar etwas darunterliegen (Wiederanstieg). Dementsprechend ist in den Kurven (Abb. 2) die Senkung im ersten Abschnitt um so steiler, je größer die Röhrenzahl ist, im zweiten bei allen Kurven etwa gleich schwach, während der dritte Kurventeil waagerecht oder leicht ansteigend verläuft.

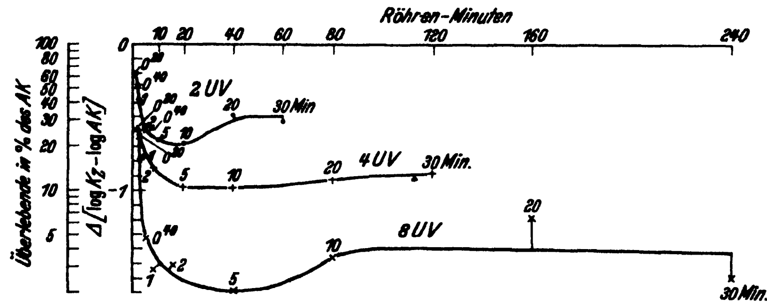


Abb. 5. Senkung des Keimzahllogarithmus und Energieverbrauchs in Röhrenminuten bei 2, 4, 8 UV-Röhren. Bei den einzelnen Versuchspunkten ist die Bestrahlungsdauer angegeben. Ordinate: Δ ($\log K_z - \log AK$). Abszisse: Röhrenminuten.

Die 40-Sekunden-Linie (Abb. 4) zeigt, daß durch Vermehrung der Röhrenzahl (bzw. der Intensität der Bestrahlung) die logarithmische Abtötung proportional der Röhrenzahl weiter gesteigert werden kann. Unsere Versuche haben bis jetzt also keinen Hinweis auf die Existenz absolut UV-resistenter oder geschützter Keime ergeben. In Wirklichkeit wird allerdings die Abtötung bei weiterer Erhöhung der Röhrenzahl durch die geringe Eindringungstiefe des UV ihre Grenze finden.

Aus dem Kurvenverlauf ergibt sich, daß es vorteilhaft sein wird, die Röhrenzahl zu erhöhen, um die Abtötung im ersten Abschnitt zu steigern, während eine längere Bestrahlung unzweckmäßig wäre; denn sie bedingt einen größeren Stromverbrauch, ohne die Abtötung entsprechend zu erhöhen.

Die zu einer Bestrahlung verbrauchte Energie ist proportional der Röhrenzahl und der Bestrahlungsdauer. Für unsere Zwecke genügt es, wenn wir als Energieeinheit die Röhrenminute verwenden, d. h. die Energiemenge, die von einer Röhre in 1 Minute abgegeben wird. Je größer der Erfolg, hier die Senkung des Keimzahllogarithmus, im Verhältnis zum Energieverbrauch ist, desto größer ist der Wirkungsgrad (Nutzeffekt) der Bestrahlung.

Da die Senkung des Keimzahllogarithmus nicht proportional der Zeit zunimmt (Abb. 4), folgt, daß bei gleicher Röhrenzahl der Nutzeffekt mit wachsender Bestrahlungsdauer sinkt. Ferner ist die Senkung außer für 40 Sekunden nicht proportional der Röhrenzahl; daraus ergibt sich, daß bei gleicher Bestrahlungsdauer oberhalb 40 Sekunden der Nutzeffekt mit wachsender Röhrenzahl sinkt.

Weitere Aufschlüsse geben Kurven (Abb. 5), aus denen abgelesen werden kann, welcher Erfolg mit dem gleichen Energieverbrauch (Röhrenminuten) bei verschiedener Röhrenzahl erzielt wird. Während der Nutzeffekt mit steigender Röhrenzahl bei gleicher Bestrahlungsdauer sinkt, steigt er für gleichen Energieverbrauch mit steigender Röhrenzahl, wobei, was für die Praxis wichtig ist, die erforderliche Bestrahlungszeit abnimmt.

Die gleiche Energiemenge, 10 Röhrenminuten, wird z. B. verbraucht bei Bestrahlung mit zwei Röhren während 5 Minuten, mit vier während 2,5 und acht während 1,25 Minuten. Die hierdurch erzielte logarithmische Abtötung wächst aber mit der Röhrenzahl: der Keimzahllogarithmus wird gesenkt um etwa 0,65, 0,87, 1,53, die Keimzahl also auf 22, 13,5, 2,95 % der Anfangskeimzahl.

Alle drei Kurven biegen bei etwa 10 Röhrenminuten zur Horizontalen um, die weitere Bestrahlung ist fast wirkungslos, obwohl sie, wie aus Abb. 5 hervorgeht, 5-, 11-, 23mal soviel Energie verbraucht. Die Maximalwirkung wird also stets mit etwa derselben wirksamen Energiemenge erzielt, nämlich mit diesen 10 Röhrenminuten; sie ist aber um so stärker und tritt um so früher ein, je größer die Röhrenzahl ist.

Durch Vermehrung der Röhrenzahl wird also innerhalb gewisser Grenzen eine weitere Verstärkung und Beschleunigung der Abtötung ohne größeren Energieaufwand möglich sein. Sollte sich die aufgestellte Regel bestätigen, so wäre z. B. zu erwarten, daß mit 15 Röhren die Maximalwirkung schon nach 40 Sekunden eintritt und größer ist als mit acht Röhren in 1,25 Minuten.

Während sich bei den Versuchen von *Lembke*, *Rickert* und *Thomsen* (1940) die annähernde Gültigkeit des *Bunsen-Roscoe*schen Gesetzes herausstellte, die Abtötung bei gleichem Produkt aus Intensität und Zeit also annähernd gleich war, gilt dieses Gesetz für unsere Versuche nicht, es steigt vielmehr mit zunehmender Intensität die Abtötung sehr stark an.

Wenn es sich um eine Ein-Treffer-Tötung bei homogenem Zellmaterial handelte, müßte nach *Jordan* (1939) das *Bunsen-Roscoe*sche Gesetz gelten, es dürfte kein Zeitfaktor mitwirken. Auch der nach oben konkave Verlauf der Kurven (Abb. 2) ist offenbar auf die Inhomogenität des Zellmaterials zurückzuführen (*Jordan*, 1939), wobei zuerst die empfindlicheren Zellen abgetötet werden und die Überlebenden im Durchschnitt unempfindlicher oder besser abgeschirmt sind.

Die Annahme, daß zur Abtötung eines Keimes mehrere Treffer in kurzem Zeitabstand nötig sind, könnte einen Anstieg der prozentualen Abtötung mit wachsender Bestrahlungsintensität erklären. Die Wahrscheinlichkeit mehrerer Treffer kurz nacheinander steigt ja mit der Bestrahlungsdichte; und auch etwas tiefergelegene Keime können dann genügend Treffer erhalten.

Zusammenfassung.

1. Werden Fische während eines Lagerungsversuchs bei + 6° C wiederholt 30 Minuten lang mit UV-Licht bestrahlt (zwei UV-Röhren, Wellenlänge in der Hauptsache 2537 Å), so ist die Keimzahlsenkung bei der ersten Behandlung verhältnismäßig am größten und nimmt dann immer mehr ab. Der Keimzahllogarithmus wird bei Versuchsbeginn am 2., 5. und 7. Versuchstag z. B. um 0,93, 0,77, 0,42 und 0,12, die Keimzahl also auf 12, 17, 38 und 76 % der vorher vorhandenen Keime gesenkt. Mit steigender Keimzahl werden also verhältnismäßig immer weniger Keime abgetötet.

2. Einmalige Behandlung von Seefischfilets mit zwei, vier oder acht UV-Röhren ergibt einen starken Keimzahllogarithmus-Abfall etwa innerhalb der ersten 40 Sekunden, einen schwächeren bis 5 Minuten, worauf bis 30 Minuten ein leichter Wiederanstieg erfolgt.

3. Die Senkung des Keimzahllogarithmus erfolgt um so schneller und ist um so größer, je höher die Röhrenzahl ist.

4. Bei einer Bestrahlungsdauer von 40 Sekunden sank mit zwei, vier und acht Röhren der Keimzahllogarithmus um 0,28, 0,79 und 1,33, die Keimzahl also auf 52, 16 und 4,7 %. Selbst bei der stärksten Abtötung blieben also von $5{,}89 \times 10^6$ Keimen je qcm Oberfläche immer noch $2{,}75 \times 10^5$ übrig.

5. Bis 40 Sekunden ist die logarithmische Gesamtabtötung proportional der Röhrenzahl, also die Abtötung je Röhre konstant: jede weitere Röhre senkt den Keimzahllogarithmus um 0,17, die noch vorhandene Keimzahl auf 72 %.

6. Die weitere Gesamtabtötung von 40 Sekunden bis 5 Minuten ist konstant, der Keimzahllogarithmus sinkt um 0,64. Ganz unabhängig von der Röhrenzahl wird die Keimzahl auf 44 % des Wertes bei 40 Sekunden gesenkt. Die logarithmische Abtötung ist also umgekehrt proportional der Röhrenzahl.

7. Die bisher vorliegenden Versuche ergaben noch kein Anzeichen für eine Grenze der Gesamtabtötung, also für die Existenz völlig resistenter oder vor dem UV geschützter Keime.

8. Im Gegensatz zu den Fischlagerungsversuchen mit mehrmaliger Bestrahlung steigt bei einmaliger Bestrahlung von Fischfilets die ogarithmische Abtötung mit steigender Oberflächenkeimzahl. Es

werden also nicht nur absolut, sondern auch verhältnismäßig mehr Keime abgetötet.

9. Als Maß für die absorbierte Strahlung dient die Röhrenminute, d. h. die Strahlungsenergie, die von einer Röhre in 1 Minute geliefert wird. Fast die gesamte Abtötung wird stets mit etwa derselben wirksamen Energie, nämlich mit 10 Röhrenminuten, erzielt, also bei zwei Röhren in 5 Minuten, bei vier in 2,5 und bei acht in 1,25 Minuten. Dabei wird der Keimzahllogarithmus um 0,65, 0,87 und 1,52, die Keimzahl auf 22, 13,5 und 2,95 % gesenkt. Die gesamte während der weiteren Versuchsdauer zugeführte (5-, 11- und 23mal so große) Energie bleibt fast wirkungslos.

10. Bei gleicher Röhrenzahl sinkt der Wirkungsgrad (logarithmische Abtötung je Röhrenminute) mit wachsender Bestrahlungsdauer.

11. Bei gleicher Bestrahlungsdauer sinkt der Wirkungsgrad mit wachsender Röhrenzahl; nur bis 40 Sekunden bleibt er konstant.

12. Bei gleichem Energieverbrauch steigt der Wirkungsgrad mit wachsender Röhrenzahl. Die Abtötung wird stets mit derselben wirksamen Energie (10 Röhrenminuten) erzielt, steigt aber mit wachsender Röhrenzahl sehr stark an bei gleichzeitiger Abnahme der erforderlichen Bestrahlungszeit.

13. Das *Bunsen-Roscoe*sche Gesetz gilt für unsere Versuche nicht, denn nicht die zugeführte Gesamtenergie, das Produkt aus Intensität und Zeit, ist für die Wirkung maßgebend, sondern die Intensität. mit der ihr *wirksamer* Anteil zugeführt wird.

14. Der Erfolg der UV-Behandlung hängt bei Fischfilets weitgehend von deren Vorbehandlung und Qualität ab.

Nachtrag.

In unserer zweiten Mitteilung (*Schwartz* und *Zeiser*, 1939) bitten wir, folgende Stellen zu berichtigen: Unterschrift zu Abb. 2: statt $\pm 0^0$ C muß es heißen $+ 6^0$ C. — Auf S. 333, Zeile 5 von oben muß es heißen: „. . . verläuft also proportional der Zunahme des Keimzahllogarithmus“. Der erste Satz auf S. 335 oben: „Hierfür spricht . . .“ ist an dieser Stelle einzufügen. — Auf der letzten Zeile S. 337 muß es heißen: weniger fest statt fester und auf der zweiten Zeile von oben, S. 338, schwächer statt stärker.

Literatur.

Jordan, P., Protoplasma **32**, 464, 1939. — *Lembke, A., G. Rickert* u. *H. Thomsen*, Vorratspflege und Lebensmittelforschung **3**, 534, 1940. — *Müller, R.*, Lehrbuch der Hygiene, Teil II. München-Berlin, 1939. — *Schwartz, W.*, u. *Th. Zeiser*, diese Zeitschr. **10**, 322, 1939. — *Zeiser, Th.*, u. *W. Schwartz*, Centralbl. f. Bakt., II. Abt., **105**, 15, 1942. — *Zeiser, Th.*, ebenda, II. Abt., im Druck.

(Aus dem Versuchs- und Forschungsinstitut der Kriegsmarine für Lebensmittelfrischhaltung, Hannover.)

Über den Verlauf des Absterbens von Mikroorganismen bei wiederholtem Gefrieren.

Von

Bernd Stille.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 1. Mai 1943.)

Untersuchungen über die Wirkung niedriger Temperaturen auf Mikroorganismen reichen bis in die Frühzeit der Bakteriologie zurück. Sie führten zu zahlreichen — oft gegenteiligen — Ergebnissen und verschiedenen, sich teils ergänzenden, teils widersprechenden Theorien über den Verlauf des Kältetodes, die im wesentlichen in der Protoplasmamonographie von *J. Bělehrádek* zusammengefaßt sind.

Während der Einfluß der Hitze eine restlose Abtötung aller Keime herbeiführt, bewirken tiefe Temperaturen, selbst die der flüssigen Luft, in der Regel nur eine mehr oder minder stark in Erscheinung tretende Abnahme der ursprünglich vorhandenen Keimzahl. Dabei sei jedoch von jenen Formen — vor allem unter den pathogenen Arten — abgesehen, deren Lebensbereich innerhalb enger Temperaturgrenzen eingeschlossen ist, und die bereits durch eine geringfügige Abkühlung vernichtet werden.

Die Verringerung der Keimzahl durch das Gefrieren weist bei den einzelnen Mikroorganismenarten zum Teil erhebliche Unterschiede auf, und auch innerhalb ein und derselben Art ergeben sich bisweilen beträchtliche Abweichungen. Alter der Kultur und besonders die Zusammensetzung des Milieus, in dem sich die Organismen während des Gefrierens befinden, spielen dabei eine ausschlaggebende Rolle. So nimmt z. B. die Frostempfindlichkeit von *Saccharomyces cerevisiae* nach eigenen Untersuchungen mit steigender Konzentration der Wasserstoffionen zu, während die Anwesenheit bestimmter Kolloide (Gelatine, Agar) in der Aufschwemmung die Absterbequote herabsetzt. Da Sporen von *Pilzen* und *Bakterien* durchweg der Kälte widerstehen, lassen Ermittlungen an versportem Material keine sicheren Rückschlüsse auf die Kälteresistenz der vegetativen Stadien der betreffenden Arten zu. Außerdem werden die Ergebnisse mitunter auch dadurch empfindlich gestört, daß manche Bakterienarten, die in Zellverbänden vereinigt sind — insbesondere *Sarzinen*, *Streptokokken* und *Staphylo-*

kokken — durch die Kristallisation auseinandergesprengt werden und infolgedessen bei der nachfolgenden Keimzahlermittlung nach dem Plattenverfahren sogar eine Vermehrung vortäuschen können. Für eine zuverlässige statistische Auswertung derartiger Tötungsexperimente kommen daher nur solche Mikroorganismen in Betracht, die sich innerhalb einer Aufschwemmung mit Bestimmtheit in einzelne Individuen trennen lassen.

Die Tatsache, daß durch die Dynamik des Temperatursturzes und des anschließenden Auftauens nur ein bestimmter Prozentsatz der anfangs vorhandenen Keimzahl vernichtet wird, legte die Frage nahe, wie sich die Überlebenden gegenüber nochmaligem bzw. wiederholtem Gefrieren verhalten.

Die ersten diesbezüglichen Angaben veröffentlichte *Prudden* 1887. Er stellte fest, daß *Bacillus typhosus* durch einmaliges Einfrieren eine zahlenmäßige Abnahme von etwa 25% erfährt, während dreimaliges Vereisen eine Abtötung von annähernd 90% bewirkt.

Nach *Sedgwick* und *Winslow* soll wiederholtes Gefrieren und Auftauen für den Typhuserreger nur wenig schädlicher sein als dauernde Kälteeinwirkung.

Smith und *Swingle* fanden bei wiederholter Abkühlung eine stärkere Verminderung der Keimzahl als bei Dauerkälte, während *Hilliard*, *Torossian* und *Stone* dem wiederholten Eineisen nur einen unwesentlichen Einfluß auf *Bacterium coli* und *Bacillus subtilis* (letzterer Sporenbildner!) zuschreiben. Dieser Befund wurde dann in einer späteren Mitteilung von *Hilliard* und *Davis* berichtigt, da sich häufiges Einfrieren und Auftauen als bedeutend schädlicher erwies als kontinuierliche Kälte. Gleichsinnige Ergebnisse erzielte *Tohyana* mit *Vibrio comma* und *Bact. typhi.*

Wallace und *Tanner* schreiben dem abwechselnden Gefrieren und Auftauen keine schädlichere Wirkung als andauerndem Kälteeinfluß zu; ihre Befunde erstrecken sich jedoch im wesentlichen auf Sporenbildner (*Aspergillus niger, Penicillium camenberti, B. subtilis*) und scheiden daher für eine statistische Ermittlung des Absterbevorganges aus.

Nach *A.* und *S. S. Goetz* soll die Sterblichkeitsquote von *Saccharomyces cerevisiae* bei mehrfacher Abkühlung keine konstante Wahrscheinlichkeit haben, sondern trotz völlig homogener Kultur schließlich kleiner werden. Sie folgern daraus, daß bei den einzelnen Zellen eine verschieden starke Resistenz gegenüber der Kristallisation besteht, so daß die empfindlichsten zuerst kristallisieren, während die Überlebenden die folgenden Male mit größerer Wahrscheinlichkeit überstehen. Verfasser verzichteten bei der Ermittlung der Keimzahl auf das Plattenverfahren und stützen ihren Befund auf das unterschiedliche färberische Verhalten lebender und toter Zellen in $^1/_{500}$ wässeriger Methylenblaulösung. Diese Methylenblaukonzentration übt jedoch schon bei kurzer Einwirkungsdauer eine deutliche Giftwirkung auf die Hefe aus und führt somit zu unsicheren Ergebnissen.

Eigene Untersuchungen.

Material und Methode.

Da aus den bereits dargelegten Gründen sporenbildende Formen für die Untersuchungen ausscheiden mußten, wurden unter zahlreichen

Nichtsporenbildnern[1] zunächst einige wenige Arten ausgewählt, die nicht zur Bildung von Zellaggregaten neigen, sondern sich innerhalb einer Suspension ohne weiteres in Einzelindividuen trennen. Außerdem kamen für die Versuche nur solche Organismen in Betracht, die sich ohne besondere Schwierigkeiten auf einfachen Nährböden kultivieren lassen und auf dem Substrat gleichmäßige und klar umrissene Kolonien bilden, so daß sie bei der Zählung leicht zu erfassen sind. Als besonders geeignet erwiesen sich bei dieser Auswahl *Saccharomyces cerevisiae*, *Pseudomonas pyocyanea*, *Bacterium rubidaeum* und mit einer geringfügigen Einschränkung *Bacterium tenellum*. Selbstverständlich ließe sich dieser Kreis noch beliebig erweitern.

Die Stämme wurden auf D-Agar und auf Bouillongelatine gezüchtet und im Brutschrank bei 30 bzw. 20° C gehalten. Da das Alter der einzelnen Zellen auch einen gewissen Einfluß auf ihre Kälteempfindlichkeit zu haben scheint, wurde, um Altersunterschiede innerhalb des Versuchsmaterials weitgehend auszuschließen, stets nur mit ganz jungen, höchstens 2 Tage alten Kulturen gearbeitet, die sich noch in deutlicher Entwicklung und somit in lebhafter Zellteilung befanden.

Aus den Kulturröhrchen wurde stets eine bestimmte Probemenge mit einer Platinöse entnommen und in sterile physiologische Kochsalzlösung übertragen, die darauf 10 Minuten lang kräftig geschüttelt wurde, um eine gleichmäßige Verteilung aller Keime in der Flüssigkeit herbeizuführen.

Das Einfrieren der Aufschwemmungen erfolgte in verschiedener Weise: entweder wurde die Suspension zu je 10 ccm auf eine Serie von Reagensgläsern gleicher Größe übertragen, oder aber die der Bestimmung dienende Flüssigkeitsmenge direkt in sterile Petrischalen pipettiert. In letzterem Falle wurde der durch Erwärmen verflüssigte Nährboden gelegentlich bereits vor dem Gefrieren zugegeben, vor allem bei der gegenüber der Kälte besonders empfindlichen *Pseudomonas pyocyanea*. Innerhalb jeder einzelnen Versuchsreihe herrschten selbstverständlich stets konstante Bedingungen.

Die Gefriertemperatur betrug durchweg — 24° C, das Auftauen erfolgte stets bei etwa + 25° C, und zwar bei den Reagensgläsern im Wasserbad, bei den Petrischalen durch die umgebende Luft. Um den Organismen im aufgetauten Zustande keine das Ergebnis störende Entwicklungsmöglichkeit zu lassen, wurden sämtliche Versuchsgläser, soweit sie nicht der jeweiligen Bestimmung dienten, im Anschluß an das Auftauen sogleich wieder eingefroren. Das Einfrieren und Auftauen wurde bei den einzelnen Versuchsreihen insgesamt zwischen sechs- und zehnmal wiederholt, und diese gesamte Zwischenbehandlung ließ sich wegen der geringen Flüssigkeitsmengen bequem innerhalb 48 Stunden durchführen[2]. Die Keimzahlbestimmungen erfolgten nach dem *Koch*schen Plattenverfahren, dabei wurden für jede einzelne Ermittlung stets drei Parallelplatten angelegt, um den Einfluß von Streuungen auf die Ergebnisse möglichst einzuschränken.

---

[1] Herrn Oberregierungsrat Dr. *Stapp*, Biologische Reichsanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin-Dahlem, danke ich bestens für die Überlassung mehrerer Bakterienstämme. — [2] Die Versuche wurden mit den Kälteeinrichtungen der Reichsforschungsanstalt für Lebensmittelfrischhaltung Karlsruhe durchgeführt. Herrn Professor Dr. *Plank* sei auch an dieser Stelle für sein Entgegenkommen bestens gedankt.

Befunde.

Die folgenden Versuchsreihen veranschaulichen die zahlenmäßige Abnahme verschiedener Organismen unter dem Einfluß wiederholten Gefrierens und Auftauens. Dabei ist es selbstverständlich und durch die Methodik des Plattenverfahrens bedingt, daß nur solche Zellen als „überlebend" bezeichnet werden, die sich nach Zugabe des Nährbodens als vermehrungsfähig erwiesen und zur Ausbildung von Kolonien führten. Die Bezeichnung „abgetötet" ist also nur mit einer gewissen Einschränkung zu verstehen. Da den Mikroorganismen jedoch in jedem Falle die gleichen Kulturbedingungen geboten wurden (abgesehen von der wiederholten Kälteeinwirkung), hat diese Frage in diesem Zusammenhang nur ein nebensächliches Interesse.

Versuche I und II: Saccharomyces cerevisiae.

Aus 24 Stunden alter Kultur, übertragen in physiologische Kochsalzlösung. I wurde in Petrischalen, II in Reagensgläsern eingefroren. Die Keimzahl ist mit K bezeichnet; K_0 bedeutet Anfangskeimgehalt, K_i = Überlebende nach i-maligem Einfrieren und Auftauen (Tabelle I).

Tabelle I.

i	Versuch I		Versuch II		i	Versuch I		Versuch II	
	K	$\log \frac{K_i}{K_0}$	K	$\log \frac{K_i}{K_0}$		K	$\log \frac{K_i}{K_0}$	K	$\log \frac{K_i}{K_0}$
0	14 560	0,000	212 000	0,000	6	3120	0,331 − 1	28 900	0,135 − 1
1	11 120	0,883 − 1	151 000	0,853 − 1	7	2800	0,284 − 1	17 000	0,904 − 2
2	9 080	0,795 − 1	—	—	8	2050	0,149 − 1	—	—
3	6 480	0,648 − 1	—	—	9	1470	0,004 − 1	8 450	0,601 − 2
4	4 520	0,492 − 1	53 200	0,400 − 1	10	-	—	6 300	0,473 − 2
5	3 760	0,412 − 1	—	—					

In Versuch I wurden beim *ersten* Gefrieren und Auftauen 23,6 % der ursprünglich in der Suspension vorhandenen Zellen vernichtet; bei neunmaliger Abkühlung ergibt sich stets wieder eine gleichmäßige Abnahme, und zwar im Mittelwert 22,5 %. In Versuch II betragen die entsprechenden Werte 28,7 bzw. 29,6 % bei zehnmaligem Einfrieren.

Die durchweg stärkere Abnahme der Keimzahl in der Versuchsreihe II ist lediglich auf die Tatsache zurückzuführen, daß die Aufschwemmung II in Reagensgläsern, I dagegen in Form kleinerer Tropfen in Petrischalen eingefroren wurde. Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen von *Haines* überein, der beim Gefrieren bestimmter Bakterienarten ebenfalls eine stärkere Abnahme der Zellenzahl in Reagensgläsern als in dünner Verteilung auf Deckgläsern feststellte.

In Abb. 1 sind die ermittelten Zahlenwerte logarithmisch eingetragen ($\log K_i/K_0$). Die einzelnen Punkte streuen nur geringfügig um eine in der Richtung zunehmender i-Werte geneigte Gerade. Im ganzen läßt sich also klar ein exponentieller Verlauf des Absterbevorganges beim

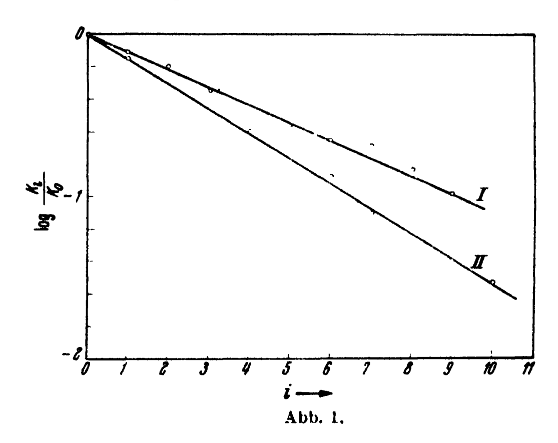


Abb. 1.

wiederholten Gefrieren und Auftauen erkennen. Da die Überlebendenquote $q = \frac{K_{i+1}}{K_i}$ = konstant ist, ergibt sich somit die Möglichkeit, bereits durch Berechnung die Zahl jener Zellen vorauszusagen, die i-maliges Einfrieren mit größter Wahrscheinlichkeit überstehen werden:

$$K_i = K_0 \cdot q^i.$$

Versuch III: Bacterium rubidaeum.

Kultur 24 Stunden alt, wurde in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt und anschließend in Reagensgläsern wiederholt eingefroren und aufgetaut. Tabelle II.

Versuch IV: Pseudomonas pyocyanea.

Es wurden kleinere Mengen einer homogenen Suspension von *Pseudomonas pyocyanea*, gleichfalls aus 24 Stunden alter Kultur, auf Petrischalen verteilt und bereits *vor* dem Einfrieren mit Bouillongelatine übergossen (Tabelle II).

Pseudomonas pyocyanea ist gegenüber dem Kälteeinfluß außerordentlich empfindlich, wie schon *Haines* feststellen konnte. In eigenen Untersuchungen erfuhren Aufschwemmungen in physiologischer Kochsalzlösung beim Einfrieren eine Abnahme der Keimzahl um 90 bis 95 %. Zusatz von Kolloiden zeigte indessen eine außerordentliche Schutzwirkung und verringerte die Absterbequote erheblich, worüber in einer späteren Mitteilung berichtet werden soll.

Als Schutzkolloid wurde in dieser Versuchsreihe Gelatine dem Agar vorgezogen, weil Agar nach dem Auftauen das ausgefrorene

Tabelle I

i	Versuch III (*Bacterium rubidaeum*)		Versuch IV (*Pseudomonas pyocyanea*)	
	K	$\log \frac{K_i}{K_0}$	K	$\log \frac{K_i}{K_0}$
0	45 000 000	0,000	2 419 000	0,000
1	8 000 000	0,250 – 1	1 532 000	0,802 – 1
2	900 000	0,359 – 2	949 000	0,594 – 1
3	280 000	0,794 – 3	632 000	0,417 – 1
4	40 000	0,949 – 4	459 000	0,278 – 1
5	7 000	0,192 – 4	290 000	0,079 – 1
6	—	—	187 000	0,888 – 2

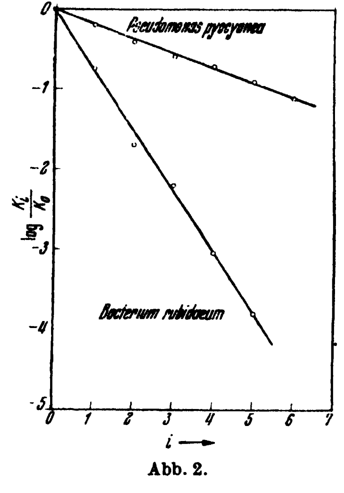


Abb. 2.

Wasser nur unvollkommen wieder aufnimmt; es entwickeln sich dann auf dem Nährboden verwaschene, ineinanderfließende Kolonien, die sich nicht auszählen lassen.

In Versuch III betrug die Keimzahlverminderung in der Aufschwemmung von *Bacterium rubidaeum* beim *ersten* Gefrieren 82,2 %. Bei fünfmal wiederholtem Temperatursturz trat jedesmal eine gleich starke Abnahme ein, und zwar im Mittelwert 82,7 %.

Den gleichen exponentiellen Verlauf zeigt die Versuchsreihe IV mit *Pseudomonas pyocyanea:* bei *ein*maligem Einfrieren gingen 36,5 % zugrunde, bei sechsmaliger Abkühlung durchschnittlich 34,7 %.

Versuch V: Bacterium tenellum.

Schließlich wurde noch ein gleichsinniger Versuch mit *Bacterium tenellum*, ebenfalls 24 Stunden alt und in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt, durchgeführt. Dabei ergab sich folgende Abnahme (Tabelle III):

Tabelle III.

i	Versuch V (*Bacterium tenellum*)		i	Versuch V (*Bacterium tenellum*)	
	K	$\log \frac{K_i}{K_0}$		K	$\log \frac{K_i}{K_0}$
0	45 600 000	0,000	3	600 000	0,119 – 2
1	12 000 000	0,420 – 1	4	100 000	0,431 – 3
2	3 900 000	0,932 – 2	5	18 500	0,608 – 4

Der Absterbeverlauf von *Bacterium tenellum* zeigt beim Vergleich mit den übrigen untersuchten Mikroorganismenarten eine geringe Abweichung: beim *ersten* Einfrieren nahm die Keimdichte um 73,7 %, beim *zweiten* nur um 66,9 % ab; dann erhöhte sich bei weiteren Abkühlungen der Anteil der Abgetöteten auf einen ziemlich konstanten Wert, im Mittel 84,3 %. Der Grund für die anfangs geringere Abnahme liegt darin, daß bei *Bacterium tenellum* die einzelnen Zellen häufig in kleineren Ketten zusammenhängen, die erst bei der Eisbildung gesprengt werden. Sobald jedoch eine restlose Trennung der Einzelindividuen erfolgt ist, ergibt sich dann mit zunehmenden i-Werten eine exponentielle Verminderung der Keimdichte.

Schlußbetrachtung.

Die oben beschriebenen Absterbereihen lassen stets eine klare, einfache Gesetzmäßigkeit erkennen: beim wiederholten Einfrieren und Auftauen verringert sich innerhalb einer homogenen Suspension gleichartiger Zellen die Keimdichte stets um den gleichen Prozentsatz. Es ergibt sich also ein ähnlicher, im Prinzip übereinstimmender Tötungsverlauf wie bei der Einwirkung bestimmter Gifte (insbesondere Phenol und Sublimat), der Hitze, der Trockenheit und verschiedener Strahlenarten (vor allem Ultraviolett- und Röntgenstrahlen), die ebenfalls ein exponentielles Absterben von Mikroorganismen herbeiführen. In ihrer Gesamtheit fand diese statistische Gesetzmäßigkeit durch die *Jordan*sche Treffertheorie ihre wohlbegründete Deutung im Sinne der Quantenphysik. *Jordan* widerlegte die früheren Auffassungen, die das ungleichmäßige Absterben von Einzellern auf Resistenzunterschiede zurückführten, und kam — insbesondere auf Grund zahlreich vorliegender Strahlenexperimente — zu dem Schluß, daß bei exponentiellem Absterbeverlauf die tödliche Wirkung primär durch je einen einzelnen „Treffer" ausgelöst wird. Alle übrigen Veränderungen, die den getöteten Einzeller charakterisieren, erfolgen demnach zwangsläufig erst sekundär als Kettenreaktion im Anschluß an den Primärakt. Die Analyse des Treffers erhärtete seinerseits die Vorstellung, daß die Bakterien ein empfindliches Steuerungszentrum — eine Art „Miniaturkern" — enthalten müssen, eine Auffassung, die durch den gleichzeitigen Nachweis gesetzmäßig strukturgebundener Thymonucleinsäure innerhalb der Bakterienzelle durch *Stille* und alsdann durch die Arbeiten von *Piekarski* und anderen Autoren ihre zytologische Fundierung fand.

Was nun das exponentielle Absterben der Mikroorganismen unter der Dynamik wiederholten Gefrierens und Auftauens anbetrifft, so ergibt sich aus diesem gesetzmäßigen Verlauf, daß jene Theorien über den Kältetod, die eine Summierung von Einzelschäden innerhalb der Zelle bzw. an ihrer Oberfläche voraussetzen, unwahrscheinlich sind.

Tabelle II.

i	Versuch III (*Bacterium rubidaeum*)		Versuch IV (*Pseudomonas pyocyanea*)	
	K	$\log \frac{K_i}{K_0}$	K	$\log \frac{K_i}{K_0}$
0	45 000 000	0,000	2 419 000	0,000
1	8 000 000	0,250 − 1	1 532 000	0,802 − 1
2	900 000	0,359 − 2	949 000	0,594 − 1
3	280 000	0,794 − 3	632 000	0,417 − 1
4	40 000	0,949 − 4	459 000	0,278 − 1
5	7 000	0,192 − 4	290 000	0,079 − 1
6	—	—	187 000	0,888 − 2

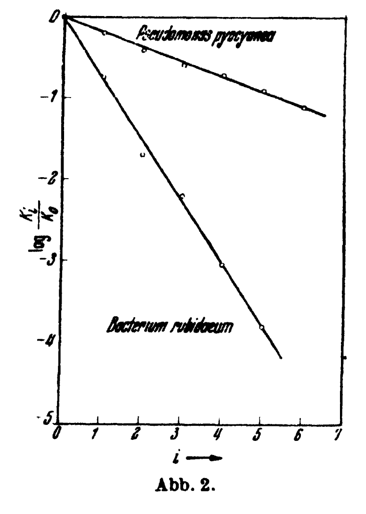


Abb. 2.

Wasser nur unvollkommen wieder aufnimmt; es entwickeln sich dann auf dem Nährboden verwaschene, ineinanderfließende Kolonien, die sich nicht auszählen lassen.

In Versuch III betrug die Keimzahlverminderung in der Aufschwemmung von *Bacterium rubidaeum* beim *ersten* Gefrieren 82,2 %. Bei fünfmal wiederholtem Temperatursturz trat jedesmal eine gleich starke Abnahme ein, und zwar im Mittelwert 82,7 %.

Den gleichen exponentiellen Verlauf zeigt die Versuchsreihe IV mit *Pseudomonas pyocyanea:* bei *ein*maligem Einfrieren gingen 36,5 % zugrunde, bei sechsmaliger Abkühlung durchschnittlich 34,7 %.

Versuch V: Bacterium tenellum.

Schließlich wurde noch ein gleichsinniger Versuch mit *Bacterium tenellum*, ebenfalls 24 Stunden alt und in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt, durchgeführt. Dabei ergab sich folgende Abnahme (Tabelle III):

Tabelle III.

i	Versuch V (*Bacterium tenellum*)		i	Versuch V (*Bacterium tenellum*)	
	K	$\log \frac{K_i}{K_0}$		K	$\log \frac{K_i}{K_0}$
0	45 600 000	0,000	3	600 000	0,119 − 2
1	12 000 000	0,420 − 1	4	100 000	0,431 − 3
2	3 900 000	0,932 − 2	5	18 500	0,608 − 4

Der Absterbeverlauf von *Bacterium tenellum* zeigt beim Vergleich mit den übrigen untersuchten Mikroorganismenarten eine geringe Abweichung: beim *ersten* Einfrieren nahm die Keimdichte um 73,7 %, beim *zweiten* nur um 66,9 % ab; dann erhöhte sich bei weiteren Abkühlungen der Anteil der Abgetöteten auf einen ziemlich konstanten Wert, im Mittel 84,3 %. Der Grund für die anfangs geringere Abnahme liegt darin, daß bei *Bacterium tenellum* die einzelnen Zellen häufig in kleineren Ketten zusammenhängen, die erst bei der Eisbildung gesprengt werden. Sobald jedoch eine restlose Trennung der Einzelindividuen erfolgt ist, ergibt sich dann mit zunehmenden *i*-Werten eine exponentielle Verminderung der Keimdichte.

Schlußbetrachtung.

Die oben beschriebenen Absterbereihen lassen stets eine klare, einfache Gesetzmäßigkeit erkennen: beim wiederholten Einfrieren und Auftauen verringert sich innerhalb einer homogenen Suspension gleichartiger Zellen die Keimdichte stets um den gleichen Prozentsatz. Es ergibt sich also ein ähnlicher, im Prinzip übereinstimmender Tötungsverlauf wie bei der Einwirkung bestimmter Gifte (insbesondere Phenol und Sublimat), der Hitze, der Trockenheit und verschiedener Strahlenarten (vor allem Ultraviolett- und Röntgenstrahlen), die ebenfalls ein exponentielles Absterben von Mikroorganismen herbeiführen. In ihrer Gesamtheit fand diese statistische Gesetzmäßigkeit durch die *Jordan*sche Treffertheorie ihre wohlbegründete Deutung im Sinne der Quantenphysik. *Jordan* widerlegte die früheren Auffassungen, die das ungleichmäßige Absterben von Einzellern auf Resistenzunterschiede zurückführten, und kam — insbesondere auf Grund zahlreich vorliegender Strahlenexperimente — zu dem Schluß, daß bei exponentiellem Absterbeverlauf die tödliche Wirkung primär durch je einen einzelnen „Treffer" ausgelöst wird. Alle übrigen Veränderungen, die den getöteten Einzeller charakterisieren, erfolgen demnach zwangsläufig erst sekundär als Kettenreaktion im Anschluß an den Primärakt. Die Analyse des Treffers erhärtete seinerseits die Vorstellung, daß die Bakterien ein empfindliches Steuerungszentrum — eine Art „Miniaturkern" — enthalten müssen, eine Auffassung, die durch den gleichzeitigen Nachweis gesetzmäßig strukturgebundener Thymonucleinsäure innerhalb der Bakterienzelle durch *Stille* und alsdann durch die Arbeiten von *Piekarski* und anderen Autoren ihre zytologische Fundierung fand.

Was nun das exponentielle Absterben der Mikroorganismen unter der Dynamik wiederholten Gefrierens und Auftauens anbetrifft, so ergibt sich aus diesem gesetzmäßigen Verlauf, daß jene Theorien über den Kältetod, die eine Summierung von Einzelschäden innerhalb der Zelle bzw. an ihrer Oberfläche voraussetzen, unwahrscheinlich sind.

Wenn auch die Frage nach dem Mechanismus des Kältetodes von Einzellern aus zahlreichen Gründen weiterhin offen bleiben muß, so scheint es mir doch von besonderer Bedeutung zu sein, bei derartigen Untersuchungen die Protistenzelle zumindest nicht als ein homogenes Gefüge, sondern als ein wohlstrukturiertes System mit einem differenzierten Steuerungszentrum aufzufassen. Es spricht vieles dafür, anzunehmen, daß erst die Zerstörung dieses Zentrums — sei es nun beim Einfrieren oder erst beim Auftauen — die Gesamtreaktion, den Zelltod, herbeiführt.

Literatur.

Bělehrádek, J., Temperature and living matter. Protoplasmamonographien, Bd. 8. Berlin, Borntraeger, 1935. — *Goetz, A.*, u. *S. S. Goetz*, Naturwiss. **26**, 427, 1938. — *Haines, R. B.*, Proc. Roy. Soc. London (B) **124**, 451, 1938. — *Hilliard, C. M.*, *C. Torossian* u. *R. Stone*, Science **42**, 770, 1915. — *Hilliard, C. M.*, u. *M. A. Davis*, J. of Bact. **3**, 423, 1918. — *Jordan, P.*, Radiologica **2**, 16, 166, 1938. — *Derselbe*, Naturwiss. **26**, 537, 1938. — *Derselbe*, Biol. Zentralbl. **59**, 1, 1939. — *Derselbe*, Protoplasma **32**, 464, 1939. — *Piekarski, G.*, diese Zeitschr. **8**, 428, 1937. — *Derselbe*, ebenda **11**, 406, 1940. — *Prudden, T. M.*, Med. Res. **31**, 341, 1887. — *Sedgwick, W. T.*, u. *C. E. A. Winslow*, Centralbl. f. Bact. I, **27**, 684, 1900. — *Smith, E. F.*, u. *D. B. Swingle*, Abstr. in Sci., N. Ser. **21**, 481, 1905. — *Stille, B.*, diese Zeitschr. **8**, 125, 1937. — *Tohyana, Y.*, Jap. J. Exp. Med. **8**, 327, 1930. — *Wallace, G. I.*, u. *F. W. Tanner*, Fruit Prod. J., New York **14**, 235, 1935.

(Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Deutschen Karls-Universität in Prag.)

Der Stoffwechsel heterotropher Flagellaten.

I. Mitteilung:

Kritische Besprechung der bisherigen Literatur.

Von

Karl Reinhardt[1].

(Eingegangen am 7. Juni 1943.)

Eine Durchsicht der ernährungsphysiologischen Literatur zeigt, daß verschiedene Fragen des Grundstoffwechsels, besonders solche chemisch-physiologischer Natur, durch Untersuchung der Lebensvorgänge bei Vielzellern nicht geklärt werden können. Die im Organismus der Metazoen und Metaphyten vor sich gehenden Stoffwechselprozesse sind so vielgestaltig und von so zahlreichen, von außen oft nicht zu beeinflussenden Faktoren bestimmt, daß die Verfolgung eines Reaktionsablaufes bis zu seinen letzten Grunderscheinungen meist nicht bis zur restlosen Klärung möglich ist. Es lag nahe, diese Grundfragen mit Hilfe von einzelligen Organismen einer Klärung näherzubringen, deren Zellgeschehen im allgemeinen leichter verfolgt werden kann und die vor allem der experimentellen Untersuchung weniger Schwierigkeiten bereiten als Vielzeller.

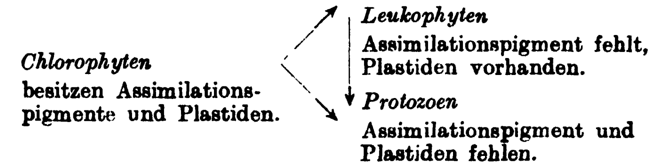
Die Auswahl der Versuchsobjekte war naturgemäß der Fragestellung entsprechend verschieden, besondere Bedeutung erlangten für gewisse Fragen u. a. Vertreter der Gruppe der *Flagellaten*. Anfangs wandte sich das Interesse fast restlos Formen zu, welche durch den Besitz eines Assimilationspigmentes zur autotrophen Kohlenstoffgewinnung befähigt, meist leicht in Reinkultur gewonnen werden konnten. Die bald erfolgte Feststellung, daß verschiedene dieser mit Assimilationspigmenten ausgestatteten Formen neben Kohlensäure auch gewisse organische Verbindungen als Kohlenstoffquelle ausnützen können, sich also „mixotroph" zu ernähren vermögen, legte eine Untersuchung des „heterotrophen" Anteils an der „mixotrophen" Ernährungsweise, also der Verwertung organischer Kohlenstoffquellen durch gefärbte Arten, nahe. Nachdem die Züchtung grüner Formen mit organischen Verbindungen im Dunkeln gelungen war, bedeuteten die ersten Züchtungsversuche farbloser Nebenformen grüner Organismen nur einen

*) Die früheren Arbeiten des Verfassers sind unter dem Namen *Ondratschek* erschienen.

weiteren Schritt in der Entwicklung des hier zu besprechenden Fragengebietes.

Die systematische Stellung der *Flagellaten* ist ein häufig erörtertes Problem. Frühzeitig unterschied man ganz allgemein zwei Hauptgruppen, die man nach dem Vorhandensein oder Fehlen eines Assimilationspigmentes dem Pflanzen- oder Tierreich zuordnete. Bezüglich der gefärbten Formen traf man bald eine Einteilung in Arten, die ausschließlich der Kohlensäure als Kohlenstoffquelle bedurften und in solche, die daneben noch Anspruch auf eine zusätzliche organische Kohlenstoff- oder Stickstoffquelle erhoben. Erstere wurden als obligat autotroph, letztere als mixotroph bezeichnet. Farblose Arten verlangten in jedem Fall organische Nährstoffe, sie wurden als heterotroph bezeichnet. Chemoautotrophie, also die Fähigkeit zur Kohlensäureassimilation ohne Assimilationspigment unter Verwertung der bei chemischen Umsetzungen frei werdenden Energie, ist bei *farblosen Flagellaten* bislang nicht bekannt. *Mast* und *Pace* (1932a, 1932b, 1934) deuten zwar für *Chilomonas paramaecium* etwas Ähnliches an, doch haben verschiedene Nachprüfungen (zuletzt *Ondratschek* 1940d) diese Befunde nicht bestätigen können.

Eine weitere Gliederung der *Flagellaten* unter Berücksichtigung der gegenseitigen Beziehungen hat *Lwoff* vorgenommen. Nachdem auch er anfänglich (1932) nur nach dem Vorhandensein oder Fehlen eines Assimilationspigmentes *Chlorophyten* und *Protozoen* unterschieden hat, stellte er später (1935a, 1936a) eine weitere Gruppe auf, die zwischen den beiden erstgenannten eine Mittelstellung einnehmen soll und die er als *Leukophyten* bezeichnete. Die drei Typen wurden in folgende Beziehungen gebracht:



Das Vorhandensein von Plastiden bei farblosen *Flagellaten* ist jedoch bisher mit einiger Sicherheit nur für einzelne *Polytoma*-Arten nachgewiesen (*Volkonsky*, 1930a, b), die obige Neugruppierung bzw. die Aufstellung des neuen Typus der *Leukophyten* entbehrt somit der nötigen experimentellen und morphologischen Grundlage.

Derzeit scheint es vorteilhafter zu sein, auf eine Festlegung der systematischen Stellung der *Flagellaten* zu verzichten und diese Organisationsstufe, die heute allgemein als Übergang und Bindeglied zwischen den beiden Organismenreichen gilt, als Einheit für sich zu betrachten. Eine Festlegung der Stellung und eine Aufgliederung kann, solange

genügende Einzelkenntnisse fehlen, keine weitere Förderung unserer Erkenntnisse zur Folge haben und erscheint somit unangebracht. Falls eine Gliederung dieser Organismengruppe sich als nötig erweisen sollte, kann diese heute zweckmäßig nur auf ernährungsphysiologischer Grundlage erfolgen, eine Einteilung nach biochemischen Gesichtspunkten ist — trotz ihrer unleugbaren Vorteile — derzeit nicht möglich, da wir über die biochemische Seite des Stoffwechsels der *Flagellaten* überhaupt nicht unterrichtet sind. Ernährungsphysiologisch können wir nachstehende Typen unterscheiden:

I. Autotrophe Flagellaten	besitzen Assimilationspigmente, können nur CO_2, nicht aber organische Verbindungen assimilieren.
II. Mixotrophe Flagellaten	besitzen Assimilationspigmente, können ihren Kohlenstoffbedarf aus anorganischen und organischen Verbindungen decken.
III. Heterotrophe Flagellaten	Assimilationspigmente fehlen, organische Kohlenstoffquellen sind unentbehrlich.

Obige Einteilung stützt sich auf die Art des Kohlenstoffgewinnes. Im Gegensatz zu *Lwoff* (1935a), der bei einem neu vorgeschlagenen ernährungsphysiologischen System der *Flagellaten* auch die Stickstoffquelle berücksichtigt, wird diese hier bewußt als nicht kennzeichnend außer acht gelassen. *Lwoff* nahm bei der genannten Aufstellung verschiedene Ansprüche der *Flagellaten* hinsichtlich der Zusammensetzung der N-Quelle an, doch sind seine Ergebnisse durch die anfängliche Vernachlässigung der Bedeutung von Wirkstoffen für die Auswertbarkeit von Stickstoffverbindungen nicht stichhaltig. In früheren Arbeiten (*Ondratschek*, 1940d, 1941a, b, c) konnte ich zeigen, daß alle bisher untersuchten *heterotrophen Flagellaten* mit Hilfe von Aneurin ihren Stickstoffbedarf aus anorganischen Verbindungen decken können, für mixo- und autotrophe Arten war diese Tatsache seit jeher bekannt. Eine Einteilung nach der verschieden hohen Organisation der erforderlichen N-Quelle (Nitrat-N, Ammon-N, Aminosäure-N, Pepton-N), wie sie *Lwoff* vornahm, ist demnach nicht zutreffend.

Die in obiger Einteilung an letzter Stelle genannte Gruppe der *heterotrophen Flagellaten* gehörte hinsichtlich der Ernährungsphysiologie bis vor kurzem zu einem der scheinbar bestuntersuchten Teilgebiete der Mikrobiologie. Wie jedoch *Provasoli* 1938 zeigen konnte, lassen sich bei genauem Vergleich der zahlreichen Arbeiten auf diesem Gebiet bemerkenswerte Unterschiede in den Ergebnissen der einzelnen Autoren feststellen. Durch die jüngsten Ergebnisse der Untersuchungen über die Bedeutung von Wirkstoffen für die Ernährung *heterotropher Flagellaten* (*Ondratschek*, 1940d, 1941a, b, c) wurden manche dieser unterschiedlichen Ergebnisse verständlich gemacht, andere blieben nach wie

vor ungeklärt. In der vorliegenden Arbeit werden weitere Faktoren aufgezeigt, welche den C- und N-Stoffwechsel der heterotrophen Flagellaten maßgeblich beeinflussen und die bisher außer acht gelassen wurden.

Die bereits erwähnten eigenen Untersuchungen des Wirkstoffbedürfnisses *heterotropher Flagellaten* haben aber darüber hinaus verschiedene grundsätzliche Bedenken an den bisherigen Ergebnissen ernährungsphysiologischer Untersuchungen dieser *Flagellaten*-Gruppe entstehen lassen, die sich in der Folgezeit, gestützt durch neue experimentelle Befunde, gesteigert haben, so daß schließlich eine grundlegende Neubearbeitung des ganzen Ernährungsproblems notwendig erschien.

Als Voraussetzung für die experimentelle Durchführung der geplanten Neuuntersuchung mußte ein kritischer Vergleich der zahlreichen, auf diesem Gebiet vorhandenen Arbeiten vorgenommen werden. Eine Neubearbeitung der angedeuteten Fragen ohne entsprechende Berücksichtigung der bisherigen Literatur hätte einmal unnötige Mehrarbeit zur Folge gehabt, andererseits aber jeglichen Zusammenhang mit den bisherigen Befunden vermissen lassen. Zur Vermeidung einer isolierten Stellung der nachfolgenden eigenen Befunde soll in der vorliegenden Mitteilung als erstes das Ergebnis der oben genannten vergleichenden Betrachtung der bisherigen Literatur wiedergegeben werden. Wenn der Rahmen weiter gesteckt wurde, als dies sonst üblich ist, so ist der Grund für dieses Vorgehen in der Bedeutung des angeschnittenen Fragengebietes zu suchen.

Der Gesamtplan der hiermit begonnenen Arbeitenreihe ist folgender: Im Anschluß an die in der 1. Mitteilung gegebene Literaturübersicht werden die verschiedenen, bisher beschriebenen Versuchsmethoden kritisch zu prüfen sein. Nach Festlegung einer bestimmten Methodik sind jene Faktoren zu untersuchen, deren grundsätzliche Bedeutung für den N- und C-Stoffwechsel in Voruntersuchungen bereits festgestellt werden konnte. Nach Abschluß der Vorarbeiten soll die vergleichende Untersuchung verschiedenster Kohlenstoff- und Stickstoffquellen hinsichtlich ihrer Eignung als Nährstoffe für *heterotrophe Flagellaten* erfolgen. Der biochemischen Seite der Stoffwechselvorgänge wird besondere Beachtung geschenkt werden. Als Endziel wird die Aufstellung eines ernährungsphysiologischen Systems auf Grund der neuen Ergebnisse beabsichtigt.

Ein Mangel der bisherigen Untersuchungen ist auch in der geringen Zahl der bearbeiteten *Flagellaten*-Arten gegeben. Hier wird außer einigen bereits wiederholt untersuchten, eine größere Zahl teils nicht untersuchter, teils neubeschriebener Arten zur Verwendung gelangen.

Historische Übersicht.

Eine Durchsicht der Literatur zeigt, daß über Fragen der Ernährung und des Stoffwechsels *heterotropher Flagellaten* zahlreiche Untersuchungen vorliegen, daß jedoch die Zahl der Bearbeiter gering ist. Einer kritischen Sichtung der Ergebnisse und einem Vergleich der

einzelnen Autoren stellen sich somit keine allzu großen Schwierigkeiten entgegen.

In der nun folgenden Besprechung der Fragestellung der einzelnen Autoren sollen besonders die Zusammenhänge der Untersuchungen sowie die Entwicklung dieses Forschungszweiges hervorgehoben werden. Die Ergebnisse werden hier nur soweit besprochen, als dies zum allgemeinen Verständnis notwendig ist, da die Befunde der einzelnen Autoren im Hauptteil dieser Arbeit an Hand der Organismen gelegentlich der Darstellung der eigenen Versuche besprochen werden müssen. Die folgenden Ausführungen sind so gehalten, daß im Hauptteil auf die Literaturangaben nicht mehr zurückgekommen werden muß. Aus Gründen der Raumersparnis und der Vereinfachung wird dort im Einzelfall nur der Autor angegeben, nähere Einzelheiten können aus dem nun folgenden historischen Teil entnommen werden.

In der Geschichte der Ernährungsphysiologie *heterotropher Flagellaten* können wir ohne Schwierigkeiten drei Hauptabschnitte unterscheiden, die jeweils durch den im Vordergrund der Betrachtung stehenden Fragenkomplex gekennzeichnet sind.

1. *Die Zeit der zoologischen Betrachtungsweise.* In diesem von 1885 bis 1921 sich erstreckenden Zeitabschnitt finden wir vornehmlich Untersuchungen zoologisch-morphologischer Richtung. In ernährungsphysiologischer Hinsicht ist diese Zeit durch mehr oder minder planlose Versuche zur Züchtung von *Flagellaten* gekennzeichnet, wobei Arbeitsmethoden der Bakteriologie mit wechselndem Glück in Anwendung gebracht wurden. Die Züchtung war nicht Selbstzweck, sie hatte nur die Aufgabe, eine größere und gleichartige Zellmenge für morphologische oder cytologische Untersuchungen bereitzustellen.

2. *Der botanisch-physiologische Zeitabschnitt.* Er umfaßt die Jahre 1921 bis 1937. Das Jahr 1921 brachte durch die erstmalig in einwandfreier Weise durchgeführte Züchtung eines *heterotrophen Flagellaten* in bakterienfreier Reinkultur eine entscheidende Wendung. Die neuen Züchtungsmethoden ermöglichen eine systematische Untersuchung der Nährstoffansprüche dieser Organismen. Umfangreiche, meist planmäßig angestellte ernährungsphysiologische Versuche kennzeichnen diesen Zeitraum.

3. *Die Zeit der physiologisch-chemischen Untersuchungen.* Seit 1937 trat infolge der Entdeckung der umfassenden Bedeutung von Wirkstoffen für die Lebensäußerungen der verschiedensten Organismengruppen auch auf dem hier zur Erörterung stehenden Forschungsgebiet eine wesentliche Änderung ein. Die Feststellung der Bedeutung einiger Wirkstoffe, vor allem solcher vitaminartiger Natur, auch für die Gruppe der *heterotrophen Flagellaten* hatte zwangsläufig eine Entwicklung zur Folge, in deren Verlauf die gesamte Ernährungsphysiologie dieser Formen immer mehr vom Standpunkt der Frage der Wachstumsfaktoren aus gesehen werden mußte. Es ergab sich somit die Notwendigkeit, die bisherigen Ergebnisse der Ernährungsphysiologie nach den neuen Erkenntnissen zu überprüfen, und endlich mußte auch der Forderung nachgekommen werden, die biochemische Seite der ernährungsphysiologischen Prozesse zu beachten. Die Biochemie des Flagellatenstoffwechsels war bis dahin überhaupt nicht untersucht worden.

Nachstehend sollen die in den genannten Zeitabschnitten erschienenen, das vorliegende Arbeitsgebiet betreffenden Veröffentlichungen behandelt werden.

1. *Die Zeit der zoologischen Betrachtungsweise.*

Der Hauptteil der in diesem Zeitabschnitt erschienenen Arbeiten befaßt sich mit Fragen morphologischer Art, von einer Besprechung kann abgesehen werden, da sie keine Ergebnisse gezeitigt haben, welche für die weitere Entwicklung von Bedeutung gewesen wären.

Die ersten Versuche zur Züchtung eines *heterotrophen Flagellaten* nahm meines Wissens *Khawkine* 1885 vor. Er untersuchte die Biologie und Ökologie von *Astasia ocellata* und züchtete diese mit Stärke als Kohlenstoffquelle. Nach unseren heutigen Kenntnissen kann der Autor nur bakterienhaltige Kulturen, vielleicht sogar nur Rohkulturen erhalten haben, wobei die anwesenden *Bakterien* möglicherweise die Stärke soweit abgebaut haben, daß die Abbauprodukte für die *Flagellaten* verwertbar wurden. *Khawkine* schenkte der Ernährungsphysiologie keine weitere Beachtung.

Eine Reihe von Jahren vergingen, ehe sich wieder ein Autor mit der Züchtung eines *farblosen Flagellaten* beschäftigte. Es war dies *Ogata*, der 1893 über die geglückte Züchtung des späteren Standardobjektes zahlreicher Autoren *Polytoma uvella* in Nährlösungen, welche vorwiegend Dekokte verschiedener Meeresalgen enthielten, berichtete. Er gibt an, bakterienfreie Kulturen erhalten zu haben, da er jedoch keine weiteren Angaben über das ernährungsphysiologische Verhalten des von ihm gezüchteten Stammes machte, kann diese Angabe heute nicht mehr nachgeprüft werden. Von den Versuchen *Khawkines* scheint *Ogata* keine Kenntnis gehabt zu haben.

Die Versuche *Ogatas* veranlaßten 1910 *Jacobsen* zu einer Wiederholung, doch gelang es ihm nicht, *Polytoma uvella* mit Algenabkochungen zur Vermehrung zu bringen. Er züchtete dann diese Art in Faulkulturen, konnte aber keine verläßlich reinen Klone isolieren. Seine Folgerungen sind dementsprechend meist nicht zutreffend und wurden in der Folgezeit wiederholt als nicht stichhaltig nachgewiesen.

Während es sich bei den eben besprochenen Arbeiten mehr um tastende Vorversuche auf völligem Neuland handelt, stellte sich 1900 *Zumstein* als erster gegen die bisherige Arbeitsweise und zeigte auf, daß nur planvolle experimentelle Untersuchungen neue Erkenntnisse zeitigen können, nicht aber theoretische Erwägungen, wie sie namentlich *Khawkine* angestellt hat und welchen eine experimentelle Grundlage vielfach fehlte. *Zumstein* selbst befaßte sich eingehend mit der Reinzüchtung von *Euglena gracilis*. Anfängliche Versuche mit chemisch nicht definierten Dekokten und Organextrakten zeigten die Unzweckmäßigkeit der bisher üblichen Versuchsanstellung auf und *Zumstein* gebührt hier das Verdienst, als erster synthetische Lösungen angewendet zu haben. Er untersuchte so auch die uns hier interessierende hetero-

trophe Ernährungsweise von *Euglena gracilis* und beschäftigte sich namentlich mit jenen Bedingungen, welche eine Rückbildung des Chlorophylls bei heterotropher Züchtung verursachten. Er erkannte die Bedeutung organischer C-Quellen für dieses Problem und hat seine Behauptungen durch zahlreiche Versuche gefestigt. Es sei noch erwähnt, daß *Zumstein* bereits auch die Bedeutung der Reaktion für den Erfolg eines Züchtungsversuchs richtig erkannt hat.

Wenn auch gewisse Feststellungen *Zumsteins*, besonders die sich auf Citronensäure als C-Quelle beziehenden, in der Folgezeit anders gedeutet werden mußten, so haben seine Arbeiten trotzdem ein großes Verdienst um die Weiterentwicklung der Ernährungsphysiologie der *Flagellaten*. Er hat nachgewiesen, daß nur genaue experimentelle Untersuchungen unsere Erkenntnisse erweitern können, nicht aber die bisher üblichen, mehr oder minder spekulativen Erwägungen, er hat erstmalig auf die Notwendigkeit chemisch definierter Nährlösungen für ernährungsphysiologische Versuche hingewiesen, welcher Forderung er als erster auch nachgekommen ist und hat so der kommenden Entwicklung Weg und Richtung gezeigt.

Das Lebenswerk *Zumsteins* wurde dann 1912 von *Ternetz* abgeschlossen und einheitlich ausgerichtet. In manchen Punkten hat *Ternetz* einen Schritt weiter getan als *Zumstein*, so u. a. bei der Beschreibung einer „hyalinen Lichtform“ von *Euglena gracilis*. Es scheint hier wohl eine Verwechslung mit *Astasia* vorgelegen zu haben.

Zur gleichen Zeit, als *Zumstein* seine klassischen Versuche mit *Euglena* anstellte, versuchte *Aragao* (1910) einen weiteren *Flagellaten* in Kultur zu nehmen, *Polytomella agilis*. Da er in die bereits von *Zumstein* herausgestellten Fehler der vorangegangenen Zeit verfiel, nimmt es nicht wunder, wenn seine Versuche zu keinem einwandfreien Ergebnis geführt haben.

Die Arbeit *Aragaos* hat in der Folgezeit besonders *Doflein* angeregt, der in zwei Mitteilungen (1916 u. 1918) über eigene Versuche zur Ernährungsphysiologie von *Polytomella agilis* berichtete, wobei er besonders die Bedeutung von „Zucker“ als Nährstoffquelle hervorhob. Schon diese Angabe zeigt, daß *Doflein* über keine Reinkulturen verfügt haben kann, denn die genannte Art ist zur Verwertung irgendeines „Zuckers“ nicht befähigt, so daß angenommen werden muß, daß anwesende *Bakterien* den „Zucker“ in eine von *Polytomella* assimilierbare Form umgewandelt haben.

Die Ergebnislosigkeit der meisten hier besprochenen, planlos angestellten Untersuchungen haben 1920 *Pringsheim* veranlaßt, auf dem von *Zumstein* angegebenen Wege zu einer Reinkultur von *Polytoma uvella* zu gelangen. Dank der von *Zumstein* angeführten Arbeitsweise gelang die Isolierung und Reinzüchtung in einwandfreier Form.

2. Der botanisch-physiologische Zeitabschnitt.

Die Bedeutung *farbloser Flagellaten* für die Erweiterung allgemeiner ernährungsphysiologischer Kenntnisse stand seit langem fest, systematische Versuche über die Ernährungsphysiologie *heterotropher Flagellaten* setzten aber das Vorhandensein absoluter Reinkulturen voraus. Als die Reinzüchtung einer Art (*Polytoma uvella*) *Pringsheim* 1920 gelungen war, untersuchte dieser Autor (1921) in eingehender Weise die Gewinnungsmöglichkeiten von Ausgangsmaterial, das Ansetzen von Anhäufungskulturen sowie weitere Reinzüchtungsmöglichkeiten mittels des *Koch*schen Plattengußverfahrens. Die angestellten ernährungsphysiologischen Versuche haben vor allem einen wesentlichen Fortschritt gebracht, insofern sie nachwiesen, daß nicht Zuckerarten, sondern niedere Fettsäuren, namentlich Essigsäure, die günstigsten Kohlenstoffquellen darstellen. *Pringsheim* untersuchte in ähnlicher Weise auch eine *Astasia*- und eine *Chilomonas*-Art, konnte aber zu keinem eindeutigen Ergebnis gelangen, da ihm die absolute Reinkultur nicht gelang.

Unter Außerachtlassung bisheriger Ergebnisse wandte sich *Oehler* (1924) der gleichen Frage zu, versuchte jedoch die Züchtung in der früher besprochenen Weise mit Lösungen unklarer oder unbekannter chemischer Zusammensetzung und kam dadurch auf Abwege.

Die Bedeutung niederer Fettsäuren für die Kohlenstoffernährung *heterotropher Flagellaten* war im Gegensatz zur bisher angenommenen Ernährungsweise mit „Zucker" eine so gewichtige, daß eine Nachuntersuchung dieser Verhältnisse notwendig war, die dann auch von *Pringsheim* und *Mainx* (1926) im Anschluß an die oben besprochenen Ergebnisse des ersteren vorgenommen wurde. Die Abhängigkeit der untersuchten Arten von Monocarbonsäuren konnte neuerdings bestätigt werden, so daß man hier mit Recht von „Fettsäure-Organismen" sprechen durfte,. *Pringsheim* gebrauchte mitunter den noch engeren Ausdruck „Acetat-Flagellaten", welcher gut die Bedeutung der Essigsäure als vornehmlichste Kohlenstoffquelle zum Ausdruck bringt. Darüber hinaus stellen die beiden Autoren hier erstmalig die Notwendigkeit von „Wuchsstoffen" für die Züchtung *heterotropher Flagellaten* fest, welche in den „Humusstoffen" der Erdabkochung wie auch in karamelisiertem Zucker gegeben sein sollen. Ihre Anwesenheit ist zur üppigen Vermehrung in einer einfach zusammengesetzten Nährlösung notwendig. Ein weiterer bemerkenswerter Befund gelang bei der Untersuchung verschiedenster organischer Stoffe hinsichtlich ihrer Eignung zur Stärkebildung. Es konnte festgestellt werden, daß ein Stoff, der keine Stärkebildung ermöglicht, auch für die Ernährung unbrauchbar ist.

Ein bisher noch unbekannter Faktor war die Stickstoffernährung *heterotropher Flagellaten.* Hier setzten die Untersuchungen von *Lwoff*

(1929) ein, der die Bedeutung von Peptonen als Stickstoffquellen in Gegenwart niederer Fettsäuren als Kohlenstofflieferanten für *Polytoma uvella* aufzeigen konnte. Nachdem somit einige gesicherte Ergebnisse über die Ernährung der *heterotrophen Flagellaten* vorlagen, trat die Frage der Mineralstoffernährung in den Vordergrund. *Lwoff* (1937) wies auf die Notwendigkeit von Eisen für *Polytoma uvella* hin. Die bisher verwendeten Nährlösungen enthielten von Mineralsalzen nur $MgSO_4$ und K_2HPO_4 (bzw. KH_2PO_4), *Lwoff* zeigte durch analytische Versuche die Lebensnotwendigkeit von Eisen. Hier sei allerdings festgestellt, daß die in den vorstehend besprochenen Arbeiten zur Verwendung gelangten Nährlösungen zwangsläufig auch Eisen enthalten haben müssen, sei es in Form von Verunreinigungen der Nährstoffe oder aus dem Glas der Versuchsgefäße stammend. In einer Zusammenfassung gibt dann der gleiche Autor 1931 eine Übersicht über die bisher bekanntgewordenen Tatsachen bezüglich der Kohlenstoffernährung von *Polytoma uvella*.

Neben *Polytoma uvella* stellt *Euglena gracilis* auch weiterhin eine häufig untersuchte Art vor. So hat *Dangeard* (1921) über eine durch 8 Jahre erfolgte Züchtung im Dunkeln berichtet, womit das Vermögen von *E. gracilis* zur ausschließlich heterotrophen Lebensweise nachgewiesen ist. Einen weiteren Beitrag kann man in einer Mitteilung von *Mainx* (1927) erblicken, der unter anderem die Verwertbarkeit von Aminosäuren als Nährstoffe für *Eugleninen* nachwies. Eine weitere Untersuchung des Kohlenstoff- und Stickstoffbedarfs dieser Gruppe nahmen *Lwoff* und *Dusi* (1929) sowie *Dusi* (1930a, b, c, d) vor, wobei der Einfluß der Reaktion auf die Vermehrung und die Auswertbarkeit gewisser Stickstoffquellen von chemisch bekannter Zusammensetzung im Vordergrund der Betrachtung standen, auch wurde ein Vergleich der autotrophen und der heterotrophen Lebensweise vorgenommen. Im Anschluß daran erfolgte eine Feststellung über den Stickstoffbedarf an einer Reihe weiterer Aminosäuren durch *Dusi* (1931).

Wir sehen um das Jahr 1930 eine Fülle von Einzelbefunden auf dem Gebiet der Ernährungsphysiologie *heterotropher Flagellaten*, die teils übereinstimmten, teils aber in Gegensatz zueinander standen. Eine kritische Sichtung war notwendig geworden, die dann auch *Lwoff* (1932) vornahm. Von den hier zur Untersuchung stehenden *Flagellaten* wurden vornehmlich *Polytoma uvella* und *Euglena gracilis* behandelt, wobei hinsichtlich der letzteren Art in diesem Rahmen nur die mit Dunkelkulturen erzielten Ergebnisse von Bedeutung sind. *Lwoff* nahm vor allem zur Versuchsanstellung der einzelnen Autoren Stellung und zeigte namentlich die Fehlermöglichkeiten der Methodik von *Pringsheim* auf, der seine Versuche nur einmal durchgeführt haben soll. Im Gegensatz dazu wies *Lwoff* darauf hin, daß seine eigenen Ergebnisse immer an

einer Reihe von Passagen nachgeprüft wurden. Bezüglich der Stickstoffernährung stellte *Lwoff* eine geringe Eignung anorganischer Stickstoffquellen fest, die im Vergleich mit Asparagin nur sehr geringe Vermehrung ermöglichen. Auf die Gründe dieses, wie wir heute wissen, nicht richtig gedeuteten Verhaltens soll später im Zusammenhang mit der Wirkstofffrage näher eingegangen werden. Auch die Kohlenstoffernährung wurde in der genannten Mitteilung kritisch untersucht und schließlich die Behauptung aufgestellt, daß nur Essigsäure und n-Buttersäure geeignete Kohlenstoffquellen darstellen. Die Auswertbarkeit einer Kohlenstoffquelle will *Lwoff* nicht von der Anzahl der C-Atome im Molekül abhängig sehen, sondern von der Zahl der CH_2-Gruppen. Eine wesentliche Feststellung war damit nicht getan

Die Besonderheiten des ernährungsphysiologischen Verhaltens *heterotropher Flagellaten* veranlaßte *Lwoff*, die gesamten Erscheinungen einheitlich zusammenzufassen und mit dem Ausdruck „Oxytrophie" zu belegen, ohne allerdings eine genaue Bestimmung dieses neuen Begriffes zu geben. Anfänglich bedeutet „Oxytrophie" eine Ernährungsform, welche ganz allgemein an das Vorhandensein von Plastiden gebunden sein soll, wobei sich *Lwoff* auf die Befunde von *Volkonsky* (1930a, b) stützt, der feststellen konnte, daß die Reservestoffe der *Polytoma*-Zelle in Plastiden gebildet werden. Diese Angaben stehen allerdings vereinzelt da und wurden in der Folgezeit nicht mehr bestätigt, so daß die Hauptstütze der *Lwoff*schen Oxytrophietheorie als zumindest nicht gesichert bezeichnet werden muß.

Im Bestreben, die bisher an *Polytoma uvella* und *Euglena gracilis* in Dunkelkulturen gewonnenen neuen Erkenntnisse weiter zu stützen, hatte schon *Pringsheim* (1921) Versuche zur Reinzüchtung von *Chilomonas* angestellt, die allerdings nicht geglückt waren. Neuerdings wandten sich *Mast* und *Pace* (1932a, b) dieser Fragestellung zu. Nach erfolgter Reinzüchtung glaubten die Autoren feststellen zu können, daß sich *Chilomonas paramaecium* in einer reinen Mineralsalzlösung zu vermehren vermag, also „zur Synthese von Kohlenhydraten, Fetten und Proteinen aus anorganischen Salzen, CO_2 und H_2O in Abwesenheit von Chlorophyll und Licht befähigt ist". Es müßte sich demnach um einen Fall von Chemoautotrophie handeln, wobei dies eine erstmalige Erscheinung bei *farblosen Flagellaten* wäre.

Da die genannten Ergebnisse verschiedentlich angezweifelt wurden, wandten sich die gleichen Autoren (1934) nochmals der Ernährung von *Chilomonas paramaecium* mit ausschließlich anorganischen Stoffen zu und konnten ihre obigen Befunde im wesentlichen bestätigen, treffen allerdings jetzt ihre Feststellungen in viel vorsichtigerer Weise. So heißt es u. a., daß *Ch. paramaecium* in der bewußten anorganischen Nährlösung „can grow and reproduce for many days". Die Vermehrung

ist hierbei sehr gering, gemessen an den Ergebnissen anderer Autoren (siehe zuletzt *Ondratschek*, 1940d). Außerdem geben die Verfasser nun auch die Möglichkeit zu, daß mit den eingeleiteten Gasen Verunreinigungen verschiedener Stoffe miteingebracht worden sein können, welche u. U. als Kohlenstoffquellen auswertbar waren, da diese Gase nicht besonders gereinigt wurden.

Die eben genannten Feststellungen wurden von *Loefer* (1934) einer eingehenden Nachprüfung unterzogen, wobei er die Ergebnisse der obigen Autoren nicht bestätigen konnte. *Chilomonas* war nicht imstande, seinen Kohlenstoff- und Stickstoffbedarf aus ausschließlich anorganischen Quellen zu decken, von einer Chemoautotrophie kann also keine Rede sein. Diese Angaben werden durch eine Mitteilung von *Lwoff* und *Dusi* (1934) unterstützt.

Im Anschluß an die oben besprochenen Nachprüfungen der Ergebnisse von *Mast* und *Pace* (1933a, b, 1934) nahm *Loefer* (1935a) eine neuerliche Untersuchung der Kohlenstoffernährung von *Chilomonas* unter kritischer Auswertung früherer Arbeiten vor, von welchen er feststellen mußte, daß sie häufig nicht mit absoluten Reinkulturen durchgeführt worden waren. *Loefer* richtete sein Hauptaugenmerk auf die Verwertbarkeit von Kohlenhydraten und glaubte feststellen zu können, daß eine gewisse Anzahl von ihnen, wie Arabinose, Dextrose u. a. m. von *Chilomonas* assimiliert werden können. *Loefer* scheint hier den Fehler, den er anderen Autoren vorwirft, selbst begangen zu haben, nämlich nicht mit Reinkulturen gearbeitet zu haben. Kohlenhydrate können von *heterotrophen Flagellaten* nicht abgebaut werden, eine Assimilation kann allenfalls nach vorangegangener Spaltung durch *Bakterien* erfolgen. Auch den niederen Fettsäuren schenkte *Loefer* eine gewisse Beachtung und fand namentlich Essigsäure und n-Buttersäure für *Chilomonas* sehr geeignet. In Fortsetzung dieser Arbeiten untersuchte *Loefer* (1935b) auch das Stickstoffbedürfnis dieses Organismus. Er zeigte auf, daß gewisse Peptone die besten Stickstoffquellen darstellen, während Aminosäuren nur geringe Vermehrung ermöglichen und Amide überhaupt nicht auswertbar sind. Im Anschluß daran wurde (1935c) der Einfluß der Reaktion auf die Vermehrung von *Chilomonas* untersucht und der Lebensbereich, sowie das optimale p_H festgestellt.

Die bisher besprochenen Arbeiten hatten ein ziemlich vollständiges Bild von der Ernährung sowie von den sonstigen Lebensbedingungen von *Chilomonas paramaecium* gegeben. Über die erforderlichen Kohlenstoff- und Stickstoffquellen herrscht ziemliche Klarheit, weniger jedoch über den Mineralstoffwechsel dieses Organismus. *Mast* und *Pace* (1935) begannen mit der Untersuchung eines, wie ihnen schien, besonders wichtigen anorganischen Nährstoffs, des Schwefels. Sie fanden Na_2S,

$Na_2S_2O_3$, Na_2SO_3, Na_2SO_4, Cystein und Glutathion in reduzierter wie oxydierter Form als Schwefelquellen geeignet, wobei die optimale Konzentration sehr verschieden war. Sie betrug z. B. für Na_2S rund 15,6 mg S, für Na_2SO_4 1,28 mg S und für Glutathion in reduzierter Form 0,81 mg S, jeweils für 100 ccm Nährlösung. In Abwesenheit von Schwefel ging das Wachstum und die Teilung weiter, ebenso wurde Stärke und Fett gebildet, für diese Prozesse war also Schwefel nicht notwendig. War umgekehrt Schwefel in optimaler Konzentration vorhanden und Acetat fehlte, dann wurde Stärke und Fett abgebaut und das Wachstum setzte aus, die *Flagellaten* blieben aber beweglich und teilten sich weiter. Ein, wie mir scheint, wesentlicher Befund für das Verständnis der Degenerationserscheinungen liegt in der Feststellung, daß das in *Chilomonas*-Zellen häufig auftretende ölige Fett aus Stärke gebildet wird.

Ein für die Ernährungsphysiologie *heterotropher Flagellaten* wesentlicher Faktor, dessen Bedeutung anfänglich übersehen wurde, der aber in der Folgezeit immer größere Beachtung fand, war die Reaktion der Versuchslösung. Wie bereits eingangs erwähnt, hat schon *Zumstein* 1900 auf die Bedeutung der Reaktion aufmerksam gemacht, mangels geeigneter Bestimmungsmethoden konnte aber eine nähere Untersuchung durch lange Zeit nicht erfolgen.

Pringsheim (1934) untersuchte mit neuen Methoden die Beziehungen zwischen der Lebensfähigkeit einiger *heterotropher Flagellaten* und dem p_H der Kulturlösung. Durch verschiedene Mischungen von $n/10\,NH_3$ und $n/10\,CH_3COOH$ stellte er unterschiedliche Reaktionsbereiche her und untersuchte nun, innerhalb welcher Grenzen sich bestimmte Arten am üppigsten vermehrten. Er zeigte auf, daß *Polytoma uvella* zwischen p_H 7,1 und 8,5 am besten zu gedeihen vermag, für *Polytomella caeca* wurde ein Optimum zwischen p_H 5,3 und 6,5 angegeben, *Chilomonas paramaecium* vermehrte sich üppig zwischen p_H 5,7 und 6,7. Der Autor betont die Spezifität seiner Angaben und wies nachdrücklich darauf hin, daß Angaben über den optimalen p_H-Bereich eines Organismus nur immer für eine bestimmt zusammengesetzte Lösung gemacht werden können. Wie bereits *Jahn* (1932) nachgewiesen hatte, muß aber auch der Temperaturfaktor berücksichtigt werden, da mit wechselnder Temperatur auch Verschiebungen des p_H-Optimums eintreten können.

Einer weiteren, für die Versuchsanstellung bedeutsamen Frage schenkte *Rottier* (1936a, b) Beachtung. Er untersuchte den Einfluß verschiedener Nährstoffkonzentrationen auf die Entwicklung von *Polytoma*, ebenso zeigte er die Bedeutung der Sauerstofftension für die Vermehrung dieser Art auf, wobei er seine Ergebnisse in Form von Vermehrungskurven festlegte. Wenn seine Ergebnisse auch keine wesentlichen Neuerungen gebracht haben, besteht ein Verdienst der

Untersuchungen doch darin, daß die Vermehrung mit quantitativen Methoden untersucht wurde.

Wie wir aus den bisher besprochenen Arbeiten ersehen, war die Frage, ob *heterotrophe Flagellaten* zur Assimilation von Kohlenhydraten befähigt sind, noch immer nicht zur völligen Zufriedenheit geklärt. In jüngster Zeit hat sich *Loefer* (1938) nochmals dieser Frage zugewendet und bestimmte u. a. den Dextroseabbau durch *Chilomonas paramaecium*. Seine Untersuchungen nahmen auf die neuere Literatur überhaupt keinen Bezug, sie erscheinen zumindest zweifelhaft, nachdem sämtliche Autoren bisher die Unmöglichkeit einer Ausnutzung von Kohlenhydraten durch die hier zur Behandlung stehenden Flagellaten nachgewiesen haben. Im Gegensatz dazu sind jedoch die bereits früher veröffentlichten Ergebnisse von *Loefer* und *Hall* (1936 a, b) über die Eignung von Alkohol zur Züchtung bestimmter *Flagellaten* sowie über den Stickstoffbedarf der gleichen Arten in jeder Weise stichhaltig.

Die bisher besprochenen Arbeiten haben zahlreiche neue, teils durch Nachprüfung gesicherte, teils stark bestrittene Einzelergebnisse gezeitigt. *Lwoff* und sein Mitarbeiter *Dusi* sahen sich daher in der Folgezeit genötigt, die meisten der bisherigen Arbeiten nachzuprüfen, was in einer Reihe nachstehend kurz zu besprechender Arbeiten geschah. 1934 untersuchten sie die Ernährung einiger *heterotropher Flagellaten* insbesondere in bezug auf die Auswertbarkeit niederer Fettsäuren. Nach ihren Ergebnissen ist *Polytoma uvella* imstande, neben Essigsäure auch Propion-, n-Butter- und n-Valeriansäure zu assimilieren. Hervorgehoben wird die Eignung von löslicher Stärke als Kohlenstoffquelle, das gleiche Verhalten wird auch für *Euglena gracilis* in Dunkelkulturen angegeben. Im Anschluß daran untersuchte *Lwoff* (1935 a) in gleicher Weise die Kohlenstoff- und Stickstoffernährung von *Polytomella*. Mit 0,4 % Pepton erhielt er in Anwesenheit von Acetat sehr üppige Vermehrung, während diese mit Asparagin als Stickstoffquelle nur gering war. *Lwoff* meint also, daß Asparagin keine geeignete Stickstoffquelle für *Polytomella* darstelle.

Nach *Lwoff* sah sich auch *Pringsheim* (1935) zu einer kurzen Zusammenfassung seiner bisherigen Ergebnisse veranlaßt, wobei er im wesentlichen darauf hinwies, daß die von ihm untersuchten *Flagellaten* mit Recht die Bezeichnung „Acetat-Flagellaten“ verdienen, da sie sich durchweg mit Essigsäure als Kohlenstoffquelle vermehren können.

Nachdem so eine gewisse Sichtung der bisherigen Befunde erfolgt war, konnten *Lwoff* und *Dusi* darangehen, diese Ergebnisse auch theoretisch auszuwerten. Nachdem bereits 1934 neuerdings die Oxytrophietheorie zur Diskussion gestellt worden war, wobei die Autoren Oxytrophie als die Fähigkeit chlorophyllfreier, plastidenführender Mikroorganismen zur Assimilation niederer Fettsäuren definierten,

besprach *Lwoff* (1935b) in etwas sprunghafter Weise neuerdings seine Oxytrophielehre. Er versteht nun unter Oxytrophie „physiologische Bedingungen, unter welchen organische Kohlenstoffquellen neben organischen Stickstoffquellen unentbehrlich sind". Die Oxytrophen sind also Organismen, welche neben einer organischen C- noch eine organische N-Quelle benötigen. Es handelt sich demnach um einfache C- und N-Heterotrophie. Aus welchen Gründen diese bekannte ernährungsphysiologische Erscheinung mit einem besonderen Ausdruck gekennzeichnet wurde, bleibt unverständlich, zumal die neue Begriffsbestimmung durchaus nicht fest blieb, sondern von ihrem Schöpfer selbst wiederholt verändert wurde und darüber hinaus keinerlei Erweiterung unserer Kenntnisse zur Folge hatte.

In der gleichen Mitteilung wird auch die Rolle der Essigsäure im Stoffwechsel erörtert und die Hypothese aufgestellt, Essigsäure sei nicht nur für farblose Organismen von maßgebender Bedeutung, sondern spiele darüber hinaus auch im Assimilationsprozeß grüner Pflanzen eine wesentliche Rolle, eine Behauptung, die durch keinerlei experimentelle Befunde unterbaut wird.

Verfolgen wir die gleiche Arbeit weiter, so treffen wir neuerdings auf eine neue Fassung des Oxytrophiebegriffes. Er bedeutet diesmal „die Fähigkeit zur Synthese von Reservestoffen durch Plastiden in Abwesenheit von Chlorophyll". Für die meisten *heterotrophen Flagellaten* ist jedoch das Vorhandensein von Plastiden nicht erwiesen, ferner ist darauf hinzuweisen, daß sich auch *chlorophyllführende Flagellaten* bei Züchtung im Dunkeln genau so verhalten wie *Lwoffs* „echte Oxytrophe" Wiederum kann festgestellt werden, daß die Neueinführung des unklar definierten Oxytrophiebegriffs in keiner Hinsicht die Forschung günstig beeinflußt hat.

Während sich die ernährungsphysiologischen Untersuchungen bisher auf eine kleine Anzahl von Arten beschränkt haben, sind von nun ab Bestrebungen bemerkbar, welche eine Erweiterung unserer Kenntnisse durch das Studium neuer Arten suchen. So haben *Lwoff* und *Provasoli* (1935) eine neue *Polytoma*, *P. caudatum var. astigmatum* eingehend untersucht und mit *P. uvella* verglichen. Im Anschluß daran stellte *Lwoff* und *Dusi* (1936) Versuche über die Ernährung einer farblosen *Euglenine*, *Astasia Chattoni* an. Ihre Ergebnisse werden später näher zu besprechen sein.

Die verschiedenen Unstimmigkeiten zwischen den Ergebnissen von *Pringsheim* und *Lwoff* haben schließlich *Provasoli* (1937a) veranlaßt, eine Neubearbeitung der ganzen Fragengruppe vorzunehmen. Ein wesentlicher methodischer Fortschritt dieser Arbeit ist insofern gegeben, als *Provasoli* nicht in der bisher üblichen Weise von allen Nährstoffen gleiche Konzentrationen bot, sondern eine, die chemische Struktur

berücksichtigende Konzentrationsanpassung einführte. Er zeigte, daß bei den höheren Gliedern der aliphatischen Reihe der Monocarbonsäuren eine Konzentration von 0,2 %, wie sie bisher üblich war, bereits toxisch wirkt. Für jede einzelne Verbindung wurde die geeignete Konzentration experimentell festgestellt, welche in vielen Fällen Vermehrung ermöglichte, wiewohl dies von *Pringsheim* z. B. bestritten worden war. Wie später gezeigt werden soll, war auch damit der Kern des Problems noch nicht erkannt, aber seine Ergebnisse haben den Weg für die weiteren Untersuchungen gezeigt.

Ein weiteres Problem, welches sich in der Folgezeit als überaus bedeutsam erweisen sollte, hat *Pringsheim* wiederholt angeschnitten (1935, 1936a, b, 1937a, b, c, d): Die Frage nach der Notwendigkeit gewisser „Wuchsstoffe" wie Erdabkochung oder Glucosekaramel für die Vermehrung heterotropher Flagellaten. *Lwoff* und *Lederer* (1935) beschäftigten sich mit der gleichen Frage und erhielten im Grund ein ähnliches Ergebnis wie *Pringsheim*, konnten also *Polytoma*, *Polytomella* und *Chilomonas* bei Anwesenheit von Erdabkochung mit Ammonacetat als alleinige Kohlenstoff- und Stickstoffquelle züchten, zogen aber aus diesen Befunden eine andere Schlußfolgerung wie *Pringsheim*. Da sie nämlich in ihren Versuchen auch mit Acetat und Erdabkochung allein, also ohne besondere Stickstoffquelle, eine gewisse, wenn auch geringe Vermehrung erzielt hatten, behaupteten sie, die Erdabkochung stelle lediglich eine etwas unklar zusammengesetzte Stickstoffquelle dar; unberücksichtigt blieb die Tatsache, daß in ihren eigenen Versuchen bei Zusatz einer weiteren Stickstoffquelle, z. B. Asparagin, eine weitaus üppigere Vermehrung eintrat. Aus ihren eigenen Angaben ist somit zu ersehen, daß Erdabkochung nur eine sehr gering auswertbare Stickstoffquelle für die genannten *Flagellaten* darstellt. Der Deutungsversuch der Ergebnisse *Pringsheims* ist somit nicht gelungen, die beiden Autoren haben überdies einen wesentlichen Punkt nicht beachtet: *Pringsheim* züchtet seine *Flagellaten* nicht etwa in einer Lösung von Erdabkochung plus Nährstoffen, er setzt vielmehr nur 1 Vol.-% Erdabkochung (1 : 5 verdünnt) der Grundlösung bei. Die gegebenenfalls noch vorhandene Stickstoffmenge muß durch diese doppelte Verdünnung so gering sein, daß sie das immerhin beträchtliche Bedürfnis *heterotropher Flagellaten* nach Stickstoff auf keinen Fall stillen kann. Nach wie vor ist die Tatsache gegeben, daß gewisse Stoffe, die nicht Nährstoffcharakter tragen, für die genannten *Flagellaten* notwendig sind.

Unter Berücksichtigung der oben erwähnten günstigen Ergebnisse mit „Wuchsstoffen" hat *Pringsheim* (1937 a, b, c, d) die Ernährungsweise einiger *heterotropher Flagellaten* neuerdings mit geänderter Fragestellung untersucht. Zum Unterschied von den Arbeiten der *Lwoff*schen Schule, welche durchweg in Form von kaum 2 Druckseiten umfassenden

vorläufigen Mitteilungen erschienen sind und meist keine Angaben über die Art der Versuchsdurchführung enthalten, gibt *Pringsheim* hier nähere Einzelheiten über die Art der Versuchsanstellung wie auch über den Verlauf der Versuche.

In der ersten Mitteilung dieser Arbeitenreihe (1937a) verglich *Pringsheim* die Ernährungsphysiologie von *Chlorogonium* und *Hyalogonium*, also einer gefärbten Art und ihrer farblosen Nebenform. Bezüglich der Kohlenstoffernährung stimmen beide Arten miteinander überein, was jedoch die Stickstoffversorgung betrifft, erwies sich *Hyalogonium* als bedeutend anspruchsvoller. Besonders auffallend ist auch der relativ hohe Bedarf der letzten Art an Calcium. Da der einzige bisher reingezüchtete *Hyalogonium*-Stamm verloren ging, war es im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht möglich, auf diese sonst bedeutungsvolle Art einzugehen. Alle Versuche, *Hyalogonium* wiederzufinden, scheiterten.

In der zweiten Mitteilung (1937b) konnte *Pringsheim* die bisherigen Kenntnisse über die Ernährung von *Polytoma* und *Polytomella* erweitern und festigen.

Eine weitere Mitteilung des gleichen Autors (1937c) beschäftigt sich mit dem Theoriengebäude der *Lwoff*schen Schule, wobei aufgezeigt werden konnte, wie völlig haltlos die Behauptungen *Lwoff*s sind und wie wenig sie überhaupt durch experimentelle Befunde gestützt werden. Abschließend gab *Pringsheim* (1937d) eine Übersicht über seine bisherigen Ergebnisse in Tabellenform, wobei besonders das verschiedenartige Verhalten unterschiedlicher Stämme der gleichen Art beachtenswert ist, ein Befund, der für *farblose Flagellaten* erstmalig aufgezeigt wurde.

Die eben besprochenen Angaben von *Pringsheim* über ein verschiedenartiges Verhalten von Stämmen der gleichen Art, welche sich nur durch die Herkunft unterscheiden und ebenso die Außerachtlassung der engen Beziehungen zwischen der optimalen Konzentration einer Kohlenstoffquelle und ihrem strukturellen Bau veranlaßten *Provasoli* zu einer Nachprüfung der *Pringsheim*schen Ergebnisse. In einigen Mitteilungen (1937b, 1938a, b) konnte *Provasoli* an Hand von Originalstämmen nachweisen, daß die Befunde von *Pringsheim* nicht stichhaltig sind. Bei genauer Beachtung der Versuchsbedingungen verhielten sich verschiedene Stämme der gleichen Art völlig gleichsinnig. Durch die Herabsetzung der Konzentration der Kohlenstoffquellen konnte *Provasoli* eine ganze Reihe von Stoffen, deren Assimilierbarkeit *Pringsheim* bestritten hatte, für eine Anzahl *heterotropher Flagellaten* als auswertbar nachweisen.

Nachdem *Lwoff* (1938) die Ergebnisse seiner Schule in einer eingehenden Mitteilung zusammengefaßt hatte, zeigte schließlich *Provasoli*

(1938c) auf Grund eigener Untersuchungen in einer umfangreichen und sehr gründlichen Zusammenstellung den damaligen Stand der Kenntnisse über die Kohlenstoffernährung unserer Flagellatengruppe auf.

3. *Die Zeit der physiologisch-chemischen Untersuchungen.*

Wie bereits aus verschiedenen der besprochenen Arbeiten hervorgeht, war die Züchtung *heterotropher Flagellaten* bisher nur mit komplexen Stickstoffquellen neben der üblichen Kohlenstoffquelle, also mit Peptonen oder anderen „Eiweißabbaustoffen“ möglich, oder aber mit Aminosäuren, vereinzelt auch mit Ammonstickstoff, bei Zugabe von „Wuchsstoffen“ wie Erdabkochung, Hefeextrakt, Harn, Karamel oder ähnlichen Stoffen zur Nährlösung möglich.

Während *Lwoff* die Erscheinung, daß ein Pepton einer Aminosäure als Stickstoffquelle überlegen ist, so zu deuten versucht, daß die komplexe Zusammensetzung des Peptons eine bessere Auswertbarkeit ermögliche, wies *Pringsheim* wiederholt auf den Wuchsstoffgehalt von Peptonen hin, ohne diesen aber experimentell gesondert nachzuweisen. Es blieb somit nach wie vor unbekannt, ob ein bestimmtes Pepton zufolge seines Aufbaues oder wegen eines allfälligen Wuchsstoffgehalts anderen Stickstoffquellen überlegen ist. Immerhin gaben diese Verhältnisse eine Anregung, um die Bedeutung von Wirkstoffen nun auch für *heterotrophe Flagellaten* zu untersuchen.

Auf anderen Gebieten der Mikrobiologie war man bereits näher über diese Frage unterrichtet, so gelang es *Nielsen* und *Hartelius* (1930) aus Kulturen von *Rhizopus suinus* und *Absidia ramosa* einen Stoff – Rhizopin – zu isolieren, der vermehrungsanregend auf *Aspergillus niger* wirkt. Er besteht, wie weitere Untersuchungen gezeigt haben, aus einem ätherlöslichen Anteil A, der auf die *Avena*-Koleoptile wirkt und einem Wuchsstoff B, der wasserlöslich ist und die Vermehrung von *Aspergillus niger* fördert. Wie die gleichen Autoren (1932) weiter zeigen konnten, läßt sich dieser B-Wuchsstoff auch auf chemischem Wege durch Erhitzen von Zucker mit organischen Säuren oder deren Ammoniumsalzen herstellen.

Einen weiteren, seiner chemischen Zusammensetzung nach genau bekannten Wirkstoff konnte *Schopfer* (1934) für *Phycomyces* aufzeigen, indem er die Bedeutung von Aneurin (Vitamin B_1) als Wachstumsfaktor für diesen Organismus nachwies.

Auch auf dem Gebiete der eigentlichen Bakteriologie konnten neue Befunde festgestellt werden, es sei als Beispiel nur auf *Knight* (1935) verwiesen, der die Notwendigkeit von Aneurin neben Nikotinsäure und Bios für *Staphylococcus aureus* nachgewiesen hat.

Das Wirkstoffbedürfnis *heterotropher Flagellaten* fand, wie bereits erläutert, verhältnismäßig spät Beachtung. Als erster wandten sich

Lwoff und seine Mitarbeiter, nachdem sie das Wirkstoffbedürfnis verschiedener anderer Mikroorganismen wie *Haemophilus influenzae* (1937a), *H. Ducreyi* (1937b) und von *Trypanosomiden* (1937c) untersucht hatten, den hier zur Behandlung stehenden *Flagellaten* zu. Zunächst erfolgte durch *Lwoff* und *Dusi* (1937a) die Untersuchung der Notwendigkeit von Wachstumsfaktoren für *Polytomella caeca*. Dieser Flagellat war bisher bakterienfrei nur in Gegenwart komplexer organischer Substanzen wie Pepton Vaillant oder in synthetischer Nährlösung mit Erdabkochung gezüchtet worden, deren „Wuchsstoffwirkung" *Pringsheim* (1935, 1936a) wie erwähnt auf den Gehalt an Humusstoffen zurückführte. Wie bereits oben besprochen, haben *Lwoff* und *Lederer* (1935) dagegen Bedenken erhoben, ohne aber eine andere annehmbare Erklärung geben zu können. In der Erkenntnis, daß mit Erdabkochung und ähnlichen Stoffen keine Erweiterung unserer Kenntnisse und eine Lösung des Problems zu erzielen sein wird, versuchten *Lwoff* und *Dusi* (1937b) für *Polytomella* einen definierten Wachstumsfaktor zu finden. Sie griffen auf die Ergebnisse von *Schopfer* (1935/36) und *Knight* (1937) zurück und versuchten *Polytomella caeca* in einer Nährlösung zu züchten, welche neben den notwendigen Mineralsalzen nur Natriumacetat und Asparagin enthielt. Durch einen Aneurinzusatz gelang es, die anfängliche Individuendichte von 14 Zellen im cmm auf 700 zu steigern. Die Verfasser geben zwar an, daß Aneurin noch in einer Verdünnung von $10^{-9}\%$ „wirksam" sei, unterlassen aber die Angabe der optimalen Konzentration. Mit Ammonacetat als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle konnte *Polytomella* nicht ihr Auslangen finden. Im weiteren wurde dann auch die Wirkung der beiden Bausteine des Aneurinmoleküls untersucht und festgestellt, daß *Polytomella caeca* auch mit Thiazol + Pyrimidin zu gedeihen vermag, so daß sie zur Synthese des Aneurinmoleküls aus diesen beiden Bestandteilen befähigt sein muß.

In einer weiteren Arbeit untersuchten *Lwoff* und *Dusi* (1937b) das Wirkstoffbedürfnis von *Polytoma caudatum* und *Chilomonas paramaecium*. *Lwoff* und *Provasoli* (1935) hatten bereits die Vermutung ausgesprochen, daß im Pepton ein Stoff enthalten sein muß, bei dessen Fehlen eine optimale Vermehrung nicht zu erzielen ist, *Pringsheim* war, wie wir bereits gesehen haben, zu einem ähnlichen Ergebnis gelangt. In der letztgenannten Mitteilung wurde nun dieser Stoff gesucht und dabei aufgezeigt, daß *Polytoma caudatum* in einer Nährlösung, die neben den notwendigen Mineralsalzen noch Natriumacetat und Asparagin enthält, durch Zusatz von Aneurin zu üppiger Vermehrung angeregt wird. Pyrimidin allein ist unwirksam, Thiazol allein wirkt hingegen in gleichem Maße wie Aneurin. Ob allerdings die vermehrungsbeeinflussende Substanz im Pepton Vaillant mit diesen Stoffen in Beziehung steht, konnte nicht entschieden werden. Ähnliche Verhältnisse gelten auch

für *Chilomonas paramaecium*. Bei Verwendung von Asparagin als Stickstoffquelle bewirkt Aneurin reichliche Vermehrung, es ist in seiner Wirkung durch Thiazol, nicht aber durch Pyrimidin zu ersetzen.

In einer dritten Mitteilung haben *Lwoff* und *Dusi* (1937 c) die Bedeutung von Aneurin bzw. Thiazol als Wachstumsfaktor für *Polytoma ocellatum* untersucht. Auch hier wiederum ermöglicht der Zusatz der genannten Wirkstoffe zu einer Nährlösung mit Asparagin und Acetat üppige Vermehrung. Die beiden Autoren ergänzen dann ihre Ergebnisse durch einige weitere Befunde und stellen zusammenfassend fest: *Polytomella caeca* benötigt Thiazol und Pyrimidin, *Chilomonas paramaecium*, *Polytoma caudatum* und *P. ocellatum* finden ihr Auslangen mit Thiazol, während *P. obtusum* und *P. uvella* bei Züchtung in einer Nährlösung mit Asparagin als Stickstoffquelle ohne Wachstumsfaktor zu gedeihen vermögen. Für *Euglena gracilis*, welche durch 9 Jahre im Dunkeln in einer Lösung mit Pepton und Acetat gezüchtet worden war, ist die Bedeutung von Aneurin bei Züchtung mit Asparagin nicht so leicht zu erkennen. Erst im Laufe längerer Kulturversuche erwies sich eine Überlegenheit der aneurinhaltigen Kulturen. Es konnte also aufgezeigt werden, daß Aneurin auch für die Gruppe der *heterotrophen Flagellaten* eine gewisse ernährungsphysiologische Bedeutung besitzt.

Die zuletzt besprochenen Versuche stießen verschiedentlich auf Widerspruch, selbst *Lwoff* und *Dusi* scheinen Bedenken über ihre früheren Feststellungen gekommen zu sein, denn sie untersuchten (1938) nochmals in vergleichender Weise die Züchtungsmöglichkeit *heterotropher Flagellaten* in synthetischer Nährlösung. Da ihre früheren Versuche durchweg mit einem Asparaginpräparat durchgeführt worden waren, welches einen Gehalt von Wirkstoffen nicht ausschloß, versuchten die beiden Autoren die gleichen Untersuchungen mit einem Ammoniumsalz als Stickstoffquelle zu wiederholen. Zunächst scheiterten alle Versuche. Erst als der Nährlösung nach der Sterilisierung $CaCl_2$ und Fe-Citrat zugesetzt wurde, gelang es zunächst *Polytoma obtusum* und *P. uvella* zur Vermehrung zu bringen. Die Verfasser glaubten damit einige Feststellungen von *Pringsheim* widerlegt zu haben, weil dieser das Eisen bereits vor der Sterilisation zur Nährlösung zugesetzt hatte, leider unterlassen sie die Angabe, auf welche Weise in ihren Versuchen das Eisen und Calcium keimfrei gemacht wurde. Die Verfasser stellten zusätzlich fest, daß in ihrem Fall Watte als Wuchstoffquelle nicht in Betracht käme. Wurde in weiteren Versuchen zu einer synthetischen Lösung mit Ammonacetat als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle noch Thiazol zugesetzt, dann genügte sie auch den Ansprüchen von *Polytoma caudatum* und *P. ocellatum*. Ein Zusatz von Pyrimidin und Thiazol ermöglichte schließlich auch *Polytomella caeca* und *Chilomonas para-*

maecium die Vermehrung. Während in einer vorangegangenen Mitteilung (1937b) hervorgehoben wurde, daß *Chilomonas* mit Thiazol allein sein Auslangen findet, benötigt nun der gleiche Organismus daneben noch Pyrimidin.

Ausgehend von experimentellen Untersuchungen über den Einfluß von Wirkstoffen auf die Vermehrung *mixotropher Algen* (1940a) wandte sich *Ondratschek* in einer Reihe näher zu besprechender Mitteilungen der Frage des Wirkstoffbedarfs *heterotropher Flagellaten* zu. Für mixotrophe Formen konnte bereits (1940b) aufgezeigt werden, daß der Verlauf der Ertragskurven innerhalb gewisser Grenzen nur von der Menge des zur Verfügung stehenden Wirkstoffs bestimmt wird, falls die notwendigen Nährstoffe in optimaler Konzentration vorhanden sind. Das Vitaminbedürfnis konnte schließlich (1940c) als Folge eines Verlustes des Synthesevermögens wahrscheinlich gemacht werden. Auf Grund der an Mixotrophen gemachten Erfahrungen konnte an eine Untersuchung des Wirkstoffbedürfnisses heterotropher Arten geschritten werden. Zunächst (1940d) konnte aufgezeigt werden, daß Aneurin bzw. seine Bausteine Thiazol und Pyrimidin für *Chilomonas paramaecium* nicht nur eine vermehrungsfördernde Substanz, sondern einen Wachstumsfaktor darstellen. Weitere Untersuchungen (1941a) zeigten die Rolle des Aneurins als Wachstumsfaktor für vier weitere *Chilomonaden* und drei *Polyblepharidineen* auf. In Fortsetzung dieser Arbeiten wurde (1941b) dann auch das Wirkstoffbedürfnis von insgesamt 14 *Polytomeen* und (1941c) von 3 *Astasiaceen* und 3 *Euglenaceen* geklärt. Es sind somit 28 heterotrophe Flagellaten untersucht worden, deren Abhängigkeit von Aneurin bewiesen werden konnte. Im Laufe dieser Arbeiten hatte sich gezeigt, daß neben Aneurin mitunter andere Wirkstoffe (Pseudowachstumsfaktoren, Spurenelemente) lebensnotwendig sein können, ein Befund, der zur näheren Untersuchung des Mineralstoffbedürfnisses heterotropher Flagellaten (1941e) Veranlassung gab.

Die eben besprochenen Ergebnisse ließen die bisherigen Befunde über die Ernährungsweise *heterotropher Flagellaten* in neuem Licht erscheinen. Manche Unklarheiten und Gegensätze können aus der Unkenntnis der Bedeutung von Wirkstoffen für die C- und N-Assimilation erklärt werden, darüber hinaus aber erscheinen auch die bisher als gesichert angenommenen Tatsachen als fraglich, da der Einfluß von Wirkstoffen, welche u. U. als Verunreinigungen oder Beimengungen vorhanden sein konnten, auf das einzelne Versuchsergebnis nicht abzuschätzen ist. Es ergibt sich somit die Notwendigkeit, die wesentlichsten bisherigen Befunde unter den neuen Gesichtspunkten nachzuprüfen, eine Aufgabe, der die vorliegenden Untersuchungen im Rahmen des Möglichen nachzukommen versuchen.

Die Bedeutung der Versuchsanstellung.

Die im vorangegangenen Abschnitt erörterten Versuchsergebnisse der einzelnen Autoren wurden naturgemäß mittels verschiedenartiger Versuchsanstellung und -durchführung erzielt, eine vergleichende Besprechung der wichtigsten Arbeitsweisen läßt sich auch hier nicht umgehen, da manche abweichenden Ergebnisse auf die angewendete Arbeitsweise zurückgeführt werden können. Nachstehend sollen einzelne Arbeitsverfahren, nach methodischen Gesichtspunkten geordnet, näher besprochen und miteinander verglichen werden.

1. Das lebende Material.

Die Heranzüchtung der Organismen geschah bei allen Autoren, die sich mit dem vorliegenden Fragengebiet beschäftigt hatten, in ähnlicher Weise durch Anlegen von Rohkulturen. Die einzelnen Forscher gingen dabei wohl verschiedene Wege, im Grunde kam es aber immer darauf an, in gärenden, nährstoffreichen Flüssigkeiten, sogenannten „Faulkulturen", einige wenige, mit anderem Material vom Standort eingebrachten Flagellatenzellen zur Vermehrung zu bringen. Die abbaufähige Substanz war mitunter eiweißartiger Natur (Käsereste, Peptone) oder ein Kohlenhydrat (verschiedene Stärkesorten, Dextrin, Inulin). Durch Beigabe von Erde wurde für Anwesenheit von *Bakterien* gesorgt, durch deren Stoffwechseltätigkeit die anfänglich für *Flagellaten* nicht verwertbaren Kohlenstoff- und Stickstoffquellen in für sie assimilierbare Stoffe umgewandelt wurden.

In einer mit Fibrin angelegten Faulflüssigkeit konnte *Jacobsen* (1910) nach Beimpfung mit Schlamm oder Erde Anhäufungskulturen etlicher *Flagellaten* erzielen. Bei Lichtkulturen überwogen grüne Formen, wurden die Versuche im Dunkeln aufgestellt, so häuften sich besonders farblose Arten an. *Buder* (1914) hat diese Methode übernommen, er ersetzte das Fibrin durch einige andere Stoffe, wobei sich getrocknetes Eiweiß besonders bewährt hat. *Pringsheim* (1921) zeigte dann, daß ebenso gut Gelatine und noch besser Casein zu verwenden ist. Er hat dann die Methodik der Faulkulturen noch besonders ausgebaut und (1936a) eingehend geschildert. Er verwendet als Nährstoff Käse, Erbsen oder Getreidekörner und überschichtet mit Erde oder Torf, womit gleichzeitig die Möglichkeit einer gewissen Beeinflussung der Reaktion gegeben ist. In eiweißhaltigen Faulflüssigkeiten nimmt die Reaktion infolge der NH_3-Abspaltung ständig nach der alkalischen Seite hin zu, bei Verwendung stärkehaltiger Ausgangsmaterialien werden durch die entstehenden Säuren Verschiebungen nach der sauren Seite hin beobachtet. Außerdem ist die Reaktion der mit Erde angesetzten Versuche stets alkalischer als jene der mit Torf beschickten.

Mittels dieser Arbeitsweise wurden auch die in den später zu behandelnden eigenen Versuchen verwendeten *Flagellaten*-Stämme angehäuft und in Rohkultur genommen.

Je nach den zufällig in der Faulkultur herrschenden Bedingungen gewinnt die eine oder andere Flagellaten-Art die Vorherrschaft und erfüllt in Kürze die

Faulflüssigkeit. In günstigen Fällen herrschen nur 2 bis 3 Arten vor, mitunter setzt sich das ganze Individuengemisch aus Angehörigen einer Art zusammen. Zu diesem Zeitpunkt üppigster Vermehrung kann an die Reinzüchtung gegangen werden. Abgesehen von vereinzelten Versuchen, mit Hilfe des *Koch*schen Plattengußverfahrens die Isolierung vorzunehmen, wie sie z. B. *Pringsheim* (1921) mit *Polytoma* gelungen ist, haben auch hier die meisten Autoren die gleiche Methode zur Reinzüchtung verwendet, nämlich das sogenannte „Mikropipettierverfahren". Mit Hilfe steriler Kapillaren wurden ein oder mehrere Zellen aus der Faulkultur entnommen, in sterile Lösung gebracht, nach einigen Minuten neuerdings herauspipettiert und in frische Lösung übertragen. Nach mehrmaliger Wiederholung dieses Vorganges ergaben die bakteriologischen Reinheitsprüfungen in der Regel Abwesenheit irgendwelcher biologischer Verunreinigungen. Die Arbeitsweise der einzelnen Autoren unterscheidet sich nur insofern, als manche jeweils mehrere (z. B. 20) Zellen übertrugen (u. a. *Pringsheim*), während andere (u. a. *Lwoff*) stets von einzelnen Zellen ausgingen.

Ich habe im allgemeinen die gleiche Methode benutzt (eine eingehende Schilderung gab *Pringsheim*, 1937a), hier sei nur auf einige Besonderheiten hingewiesen. Über die Art der zur Isolierung verwendeten Glaskapillaren finden sich in der Literatur so gut wie keine Angaben. *Lwoff* scheint nach allem mit Pyrexglas gearbeitet zu haben, von *Pringsheim* ist bekannt, daß seine Pipetten meist aus Kavalierglas und nur vereinzelt aus Jenaer Geräteglas bestanden. Ich konnte zu wiederholten Malen feststellen, daß die Verwendung von alkaliabgebenden Glassorten eine große Gefahrenquelle für das Versuchsergebnis mit sich bringt (s. *Ondratschek*, 1935). Bei der Isolierung wirkt sich dieser Umstand noch nicht einmal so stark aus, es tritt mitunter eine Schädigung der übertragenen Zellen ein, so daß die neu angelegten Klone nicht anwachsen, bei der Beimpfung ernährungsphysiologischer Versuche kann dieser Umstand aber zu wesentlichen Fehlurteilen führen. So kann es vorkommen, daß einem Nährstoff jegliche Eignung abgesprochen wird, obwohl tatsächlich die eingetragenen Zellen durch das Alkali des Glases irreparabel geschädigt worden waren. Wird die gleiche Lösung auf andere Weise beimpft, dann tritt starke Vermehrung ein. Besonders bedenklich wird dieser Umstand bei Beimpfung mit einzelnen Zellen. Ich verwende grundsätzlich Jenaer Glas, sowohl zur Anfertigung von Pipetten und Kapillaren, als auch in Form von Uhrschälchen, Röhrchen und Kolben. Selbst die Vorratsflaschen der Stammlösungen bestehen aus Jenaer Glas.

In der vorliegenden Arbeitenreihe wird getrachtet, alle Befunde durch möglichst zahlreiche Einzelergebnisse an den verschiedensten Arten zu erweitern. Ein Teil der hier untersuchten *heterotrophen Flagellaten* stellt erstmalig reingezüchtete, zum Teil neubeschriebene Arten dar, ein anderer Teil wurde bereits wiederholt untersucht. Nachstehend wird eine systematische Übersicht über alle untersuchten Arten gegeben.

Verzeichnis der untersuchten Arten.

A. Cryptomonaden.

Chilomonas paramaecium Ehrenberg.
Ch. longata Ondratschek.
Ch. oblonga Pascher.
Ch. coniformis Ondratschek.
Ch. globosa Ondratschek.

B. Volvocalen.

a) Polyblepharidineen.

Polytomella agilis Aragao.
P. caeca Pringsheim.
P. globosa Pascher.

b) Chlamydomonadineen.

Polytoma obtusum Pascher var. stigmata Ondratschek.
P. majus Pascher var. astigmata Ondratschek.
P. Pascheri Moewus.
P. caudatum Korschikoff var. astigmata Provasoli.
P. uvella „sensu strictu" Ehrenberg.
P. angustum Pascher.
P. minus Pascher.
P. papillatum Pascher.
P. curvatum Ondratschek.
P. coniforme Ondratschek.
P. dorsiventrale Pascher var. astigmata Ondratschek.
P. ocellatum Françé.
P. tetraoleare Pascher var. astigmata Ondratschek.
P. cylindraceum Pascher.

C. Eugleninen.

a) Euglenaceen.

Euglena gracilis Klebs.
E. gracilis Klebs var. robusta Ondratschek.
E. viridis Ehrenberg.

b) Astasiaceen.

Astasia longa Pringsheim.
A. quartana Moroff nov. comb. Pringsheim.
A. Chattoni Lwoff.

2. *Die Zubereitung der Lösungen.*

Es war wohl stets das Bestreben aller Autoren, möglichst mit chemisch reinen Stoffen ernährungsphysiologische Versuche durchzuführen. Mit zunehmender Verfeinerung der Herstellungsmethoden gelangten Präparate in den Handel, welche heute so ziemlich den meisten Anforderungen entsprechen, besonders die synthetisch bereiteten organischen Stoffe befriedigen in dieser Hinsicht vollauf. Die Angabe des chemischen Reinheitsgrades der Präparate berücksichtigt allerdings

fast ausschließlich Stoffe, welche dem Chemiker oder Techniker als allfällige Verunreinigungen unerwünscht sind. Es sind dies meist Substanzen, welche infolge ihrer nahen chemischen Verwandtschaft (Homologe z. B.) oder welche aus technischen Gründen nur schwer auszuschließen sind. Der Chemiker hat oft keinen Grund, Stoffe zu berücksichtigen, welche für den Mikrobiologen von größter Bedeutung sein können. Es sei hier nur auf die verschiedenartigsten Wirkstoffe verwiesen. Solche anorganischer Natur — Spurenelemente (Pseudowachstumsfaktoren) — können aus dem Herstellungsprozeß nur allzu leicht anwesend sein, ebenso aber auch, wie früher gezeigt werden konnte (*Ondratschek*, 1940d, 1941a, b, c), organische Wirkstoffe. So konnte u. a. ein bedeutender Wirkstoffgehalt in Peptonen, aber auch in Aminosäurepräparaten (Glykokoll, Asparagin) nachgewiesen werden. Für spezielle Arbeiten, bei denen es gerade auf diese mengenmäßig geringfügigen Beimengungen ankommt, muß daher in jedem Einzelfall eine eingehende Reinheitsprüfung, unter Umständen eine besondere Reinigung erfolgen.

Auf Grund eigener Erfahrungen wurden, um Versuchsfehler zu vermeiden und zweifelhafte Ergebnisse auszuschließen, in den folgenden Versuchsreihen durchweg frische Präparate unmittelbar von den einzelnen Werken angeschafft. Sie bieten Gewähr, daß die Möglichkeit einer gegebenenfalls eintretenden Zersetzung oder Umlagerung durch längeres Aufbewahren, weitgehend ausgeschaltet ist. Die chemischen Stoffe sind Erzeugnisse der Firmen *Merck*, *Schuchardt*, *Fränkel* und *Landau* und *Kahlbaum*. Jeweils wurde das Präparat mit höchstem Reinheitsgrad, wenn möglich synthetischer Herstellung verwendet.

Die Zubereitung der Lösungen erfolgt hier stets mit doppelt destilliertem Wasser, die Versuchsgefäße sind aus Jenaer Geräteglas. Über die Zusammensetzung der Versuchslösungen wird jeweils an geeigneter Stelle Näheres angeführt werden. Grundsätzlich erfolgt die Konzentrationsangabe in mg des wirksamen Elementes. Die übliche Angabe in % hat den Nachteil, nichts über die aktuelle Konzentration des Elementes auszusagen, besonders wenn, wie üblich, die Angabe des Wassergehalts unterbleibt. Wir schreiben also z. B. x mg Mg als $MgCl_2$ und nicht x% $MgCl_2$, oder x mg C als CH_3COONa und nicht x% Na-Acetat, bezogen jeweils auf das Versuchsvolumen. Diese Ausdrucksweise wurde für anorganische Salze bereits in einer Reihe von Mitteilungen gebraucht (*Ondratschek*, 1940 d, 1941 a, b, c, e) und hat sich bewährt.

3. *Die Beimpfung der Versuchslösungen.*

Die Art der Beimpfung einer Versuchslösung wechselte bei verschiedenen Autoren. *Loefer* beimpfte, soweit aus seinen Arbeiten ersichtlich ist, mit mehreren Zellen. Ob und wieviel Kulturfolgen er anlegte, wurde nicht angegeben. *Lwoff* beimpfte stets mit einem Tropfen einer Zellaufschwemmung und übertrug bei positivem Ausfall zu wiederholten Malen in die gleiche frische Nährlösung. Trat immer wieder Vermehrung ein, dann sprach er der geprüften

Substanz Eignung als Nährstoff zu. *Pringsheim* führte anfänglich die Beimpfung mit 1 Öse voll Zellen durch, wobei er gleichfalls einige Kulturfolgen anlegte. Später ging er dazu über, jeden Versuch mit nur einer Zelle zu beimpfen, um so anscheinend sicherere Ergebnisse zu erzielen. Wenn man aber bedenkt, daß infolge der Nichtbeachtung des Lebenszustandes die verschiedensten physiologischen Zustände zur Einsaat gelangten, und wenn man in Betracht zieht, daß durch die Alkaliabgabe der aus Kavalierglas hergestellten Pipetten leicht eine zusätzliche Schädigung dieser einzelnen Zellen eintreten konnte, dann nehmen die oft recht verschiedenartigen Ergebnisse seiner Versuche, sowie die Gegensätze zwischen seinen Ergebnissen und denen *Lwoffs* nicht wunder.

Ich habe im Laufe der Jahre eine bestimmte Beimpfungsweise ausgebaut, welche nachstehend kurz beschrieben werden soll. Bei Prüfung einer Substanz auf ihre Eignung als Nährstoff werden die ersten Versuche stets in 10 ccm Versuchslösung in Röhrchen durchgeführt, die Beimpfung erfolgt mit einem Tropfen einer Aufschwemmung von Zellen, welche in der vielfach erwähnten Nährlösung L 25 (enthält 0,1 % Pepton Vaillant und 0,2 % Natriumacetat) herangezogen worden waren. Die Anzahl der Zellen in diesem Impftropfen beträgt 20 bis 30. Tritt Vermehrung ein, werden wiederum 20 bis 30 Zellen in frische Nährlösung übertragen und dies insgesamt dreimal durchgeführt. Nach dreimaligem, positivem Ausfall steht die Eignung der Substanz als Kohlenstoff- oder Stickstoffquelle fest und es erfolgt die quantitative Bestimmung der maximalen Trockensubstanz, welche unter Verwertung des betreffenden Stoffes erzielt werden kann. Zu diesem Zweck werden 250 ccm der gleichen Versuchslösung in Kolben wiederum mit 20 bis 30 Zellen aus der letzten Kulturfolge beimpft und nach einer gewissen, je nach der Organismenart verschiedenen Zeitspanne das Trockengewicht bestimmt.

Gegen die oben erwähnte Art der Übertragung in nur drei Kulturfolgen wird oft eingewendet, daß Versuchsfehler durch aus der Ausgangskultur mit übertragene Nährstoffe auftreten können. Wenn man aber bedenkt, daß sich die eingebrachten 20 bis 30 Zellen bei *Polytoma* z. B. nach wenigen Tagen auf 20000000 vermehrt haben (2000 Zellen im cmm angenommen), dann ist es kaum wahrscheinlich, daß in einem Tropfen — etwa 0,03 ccm — so viele Nährstoffe mitgebracht werden konnten, als für den Bau- und Betriebsstoffwechsel notwendig sind. Langjährige Erfahrungen zeigen sogar, daß das Ergebnis der ersten Kulturfolge fast ohne Ausnahme bereits endgültig ist. Trotzdem werden auch in der vorliegenden Arbeit jeweils drei Übertragungen in Röhrchen angelegt, bevor ein quantitativer Versuch angestellt wird, um auch die geringste Nährstoffübertragung zu vermeiden. Zur Übertragung werden nahezu kapillar ausgezogene Pipetten aus Jenaer Geräteglas verwendet.

Es sei noch erwähnt, daß sämtliche Versuche bei 25° C im Thermostaten durchgeführt wurden.

4. *Bestimmung und Deutung der Ergebnisse.*

Wir kommen hiermit zum schwierigsten und gleichzeitig wichtigsten Gebiet der Methodik. Die Literatur zeigt, daß das Ergebnis ernährungsphysiologischer Versuche mit *farblosen Flagellaten* meist in sehr einfacher Weise angegeben wird.

Pringsheim und *Lwoff* schätzten bloß den Ernteertrag, und zwar gaben sie üppige Vermehrung mit ++ an, gute Vermehrung mit +, blieb die Vermehrung ziemlich hinter dem Durchschnitt zurück, dann wurde sie mit ± bezeichnet, bei sehr spärlicher Vermehrung mit ±. Diese Schätzungen sind mit subjektiven wie objektiven Fehlern behaftet. Es bleibt dem einzelnen Autor überlassen, was er noch als ± oder bereits — bezeichnen will, die Angabe von + besagt überhaupt nichts mehr, da daraus nicht entnommen werden kann, ob dem betreffenden Stoff noch eine gewisse Bedeutung als Kohlenstoff- oder Stickstoffquelle zukommt, oder ob etwa die geringe Vermehrung auf Kosten der Reservestoffe vor sich ging. Abgesehen von diesen subjektiven Fehlerquellen müssen aber auch solche objektiver Natur berücksichtigt werden, so kann z. B. der Reservestoffgehalt eine wesentliche Fehlerquelle bilden, denn bei gleicher Individuenzahl wird eine Kultur reservestoffreicher Zellen eine viel größere Dichte vortäuschen als eine solche reservestoffarmer Zellen. Das gleiche gilt für die Schätzung der Ernteerträge nackter (*Polytomella*) und behäuteter Zellen (*Polytoma*). Aus all dem ist ersichtlich, daß die Angabe von Schätzwerten nur eine sehr geringe Zuverlässigkeit verbürgt.

Wesentlich anders verhält sich die Angabe der Ernteerträge bei *Loefer* und *Provasoli*, welche die Höchstzahl der Zellen in cmm bestimmten. Diese Methode ist an sich brauchbar und wurde auch in früheren, eigenen Arbeiten (*Ondratschek* 1940 a, b, c, d, 1941 a, b, c, d, e) teilweise angewendet. *Loefer* verwendet nicht unmittelbar die absoluten Zahlen als Maßstab, sondern bildet einen Faktor $F = x/x_0$, wobei x_0 die Zahl der Zellen in cmm zu Beginn und x die am Ende des Versuchs darstellt. Wenn nun auch diese Methode durchaus brauchbar ist, so geht *Loefer* in manchen Fällen bei der Deutung seiner Ergebnisse doch zu weit, wie bei der Behandlung der Kohlenhydrate als Kohlenstoffquellen zu zeigen sein wird. Er nimmt auch dann noch Eignung an, wenn z. B. $x = 270$ und $x_0 = 230$ ist, und kommt dadurch zu mitunter falschen Schlüssen. *Provasoli* gibt die Zahl der Zellen in cmm an, und zwar in kennzeichnender Weise. Allerdings hielt er es für nötig, außerdem noch mit —, ± oder + die Eignung bestimmter Stoffe zu bezeichnen. Seine Kontrollversuche ohne Kohlenstoffquelle haben infolge des hohen Peptongehalts (0,4%!) eine immerhin beträchtliche Vermehrung aufzuweisen und beim Vergleich der Versuchsergebnisse mit den Kontrollen kommt es vor, daß einmal der doppelte Ertrag als +, ein anderes Mal wieder als ± oder gar ± bezeichnet wird. Wiederum sehen wir die subjektiven Fehlermöglichkeiten. Dabei hat doch das Ansteigen der Zellenzahl auf das Doppelte nichts zu besagen, denn es bedeutet bei Formen, welche 2 Tochterzellen bilden, lediglich, daß sich jede Zelle noch einmal geteilt hat, bei Arten, welche 4 oder 8 Tochterzellen bilden (*Polytoma*), sogar nur, daß sich jede 4. oder 8. Zelle geteilt hat. Zur Auswertung der Ergebnisse von *Provasoli* soll daher im folgenden nur die Angabe der durchschnittlichen Zahl der Zellen in cmm verwendet werden, da diese Zahlen verläßlich sind und ein gutes Kennzeichen über die Brauchbarkeit verschiedener Stoffe als Nährstoffe bieten.

Ich habe die in anderen Forschungszweigen seit langem übliche Methode der Feststellung des Ernteertrages durch Trockengewichtsbestimmungen übernommen und für unsere besonderen Zwecke aus-

gebaut. Die Methode hat sich in einer Reihe von Arbeiten sehr bewährt (*Ondratschek*, 1940a, b, c, d, 1941a, b, c, d, e) und liefert gut vergleichbare Zahlen. Namentlich für Bilanzversuche kann nur diese Ertragsbestimmungsart angewendet werden, da sie allein Aufschluß gibt, wieviel Leibessubstanz aus der gebotenen Nährstoffmenge entstanden ist. Die Durchführung der Trockengewichtsbestimmung ist verhältnismäßig einfach. Die Versuchslösung wird durch Jenaer Glasfiltertiegel bei mäßigem Unterdruck durchgesogen, die zurückbleibenden Zellen gewaschen und der Tiegel bei 105° C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Je nach der Größe der Zellen, wobei besonders der Durchmesser maßgebend ist, gelangen Filtertiegel mit den Porengrößen G 3 oder G 5/3 zur Verwendung. Auch die Auflagerung einer dünnen Bolusschicht hat sich bewährt. Um eine rasche Filtration zu ermöglichen, zentrifugieren wir bei den vorliegenden Untersuchungen das Zellgemisch zuerst ab, nehmen es mit 5 bis 10 ccm Wasser wieder auf und gießen diese Organismenaufschwemmung erst zum Schluß auf das Filter, die Arbeitszeit kann so wesentlich abgekürzt werden. Durch Vorhandensein einer großen Anzahl Filtertiegel konnten die Trockengewichtsbestimmungen laufend durchgeführt werden.

Von großer Bedeutung ist die Auswertung des Ergebnisses der Trockengewichtsbestimmungen. In früheren Arbeiten, die sich mit der Trockensubstanzproduktion *farbloser Flagellaten* in ihrer Abhängigkeit von Wirkstoffen beschäftigten, wurde als Vergleichsmaßstab der von *Nielsen* eingeführte Faktor $f = \frac{\text{Trockengewicht der wirkstoffhaltigen Versuche}}{\text{Trockengewicht der wirkstofffreien Kontrollen}}$ gebraucht. In der vorliegenden Arbeit kann eine ähnliche Berechnungsweise nicht angewendet werden, da die Versuche ohne Nährstoffzusatz keine wägbaren Trockenrückstände ergaben. Der genannte Faktor hätte zudem in diesem Fall nicht viel besagt. Es schien mangels anderer Möglichkeiten noch am zweckmäßigsten, die mit Essigsäure und anorganischem Stickstoff erzielten Ernten als Grundlage für Berechnungen bzw. Auswertungen heranzuziehen. Essigsäure bietet für alle untersuchten Organismen eine vorteilhafte, wenn nicht die beste Kohlenstoffquelle. Die zur Berechnung notwendigen Grundzahlen wurden durch wiederholte Bestimmungen zu verschiedenen Zeitpunkten festgelegt, wobei folgende Lösung zur Verwendung gelangte:

$5 \cdot 10^{-2}$% C als Natriumacetat,
10^{-2}% N als NH_4NO_3,
$5 \cdot 10^{-3}$% K als KCl,
$2 \cdot 10^{-3}$% P als $Na_2HPO_4 \cdot 12\,H_2O$,
10^{-3}% S als $Na_2SO_4 \cdot 10\,H_2O$,
$5 \cdot 10^{-4}$% Ca als $CaCl_2$,
10^{-4}% Mg als $MgCl_2 \cdot 6\,H_2O$,
$5 \cdot 10^{-5}$% Fe als $FeCl_3$.

Hierzu kamen noch folgende Spurenelemente: 10^{-6}% Zn als $ZnSO_4$, 10^{-8}% Mn als $MnSO_4$ und 10^{-10}% As als As_2O_3, gelöst in HCl. Diese Konzentrationen sind nach früheren Untersuchungen (*Ondratschek*, 1941e) am günstigsten.

Zu dieser Grundlösung kam zur Bestimmung der oben genannten Grundzahlen noch ein Zusatz von Aneurin in der für den betreffenden Organismus günstigsten Konzentration. Aus zahlreichen Bestimmungen wurde das Mittel gezogen und etwas abgerundet, um für die Berechnung einfache Zahlen zu besitzen.

Zur Berechnung der Auswertbarkeit einzelner Kohlenstoffquellen wurde folgende Formel zu Hilfe genommen: $F_C = \frac{T \cdot 100}{T'}$, wobei F_C den zu bestimmenden Ertragsfaktor für Kohlenstoff, T das mit einer bestimmten Kohlenstoffquelle erzielte Trockengewicht in mg und T' die Acetatgrundzahl bedeutet. Bestimmt wird also, welchen Hundertteil ein mit einer bestimmten Kohlenstoffquelle zustande gekommenes Trockengewicht von dem mit Essigsäure erzielten ausmacht.

Ein weiterer Ertragsfaktor für Stickstoff wird in der gleichen Weise nach der Formel: $F_N = \frac{T \cdot 100}{T'}$ berechnet, wobei diesmal T das mit der zu untersuchenden Stickstoffquelle erzielte Trockengewicht in mg und T' das mit NH_4NO_3 erreichte bedeutet.

Zusammenfassung.

Die vorstehenden Ausführungen geben ein Bild von der Entwicklung des vorliegenden Forschungszweiges. Dargelegt wird, daß infolge der in letzter Zeit festgestellten Bedeutung von Wirkstoffen für das gesamte Ernährungsproblem alle bisherigen Ergebnisse wankend geworden sind, so daß eine Neuuntersuchung notwendig ist. Die Bedeutung der Art der Versuchsanstellung für das Ergebnis wurde dargelegt und die eigene Methodik geschildert.

Aufgabe der nächsten Untersuchungen ist die Feststellung der Bedeutung einiger Faktoren für den Kohlenstoff- und Stickstoffwechsel. Eine Literaturübersicht wird am Schluß der Arbeitenreihe gegeben werden.

(Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Deutschen Karls-Universität in Prag.)

Der Stoffwechsel heterotropher Flagellaten.

II. Mitteilung:

Über die Beeinflussung der C- und N-Assimilierung durch einige Faktoren, insbesondere durch Wirkstoffe.

Von

Karl Reinhardt.*

(Eingegangen am 6. August 1943.)

Die Auswertung verschiedener Kohlenstoff- und Stickstoffquellen durch *heterotrophe Flagellaten*, wie auch die Art des biochemischen Abbaus ist von einer Reihe von Faktoren abhängig, ohne deren genaue Kenntnis eine Untersuchung des Stoffwechsels nicht erfolgen kann. Aufgabe der nachstehend zu schildernden Versuche war die nähere Analyse dieser Faktoren. Wie bereits in der I. Mitteilung hervorgehoben wurde, mußte hier besonders der Einfluß bestimmter Wirkstoffe untersucht werden.

1. Die Bedeutung des physiologischen Zustandes.

In den letzten Jahren hat sich die Forderung nach stärkerer Berücksichtigung des Lebenszustandes eines biologischen Versuchsmaterials (Zellgemisches) immer mehr durchgesetzt. Wie *Czurda* (1935b) forderte und in einer Reihe von Untersuchungen (1933, 1935a, 1937) auch experimentell zeigte, bietet nur die Verwendung eines physiologisch wie morphologisch definierten Zellzustandes Gewähr für die Erzielung wiederholbarer Ergebnisse. Nach *Czurda* bezeichnen wir jenen Zustand des Zellgemisches, der durch größte Homogenität und höchste Vermehrungsfähigkeit der einzelnen Zellen gekennzeichnet ist, als den „Normalzustand" des Zellgemisches. Es bedarf mitunter längerer experimenteller Untersuchungen, um durch Veränderung der Versuchsbedingungen jene Umstände ausfindig zu machen, welche es ermöglichen, der obigen Forderung zu entsprechen. Ist jedoch eine „optimale" Nährlösung gefunden, dann gelingt es durch wiederholtes Übertragen der Zellen in frische Nährlösung meist leicht, den geforderten Normalzustand zu erzielen. Der Verfasser konnte an *Desmidiaceen* zeigen

* Die früheren Arbeiten des Verfassers sind unter dem Namen *Ondratschek* erschienen.

(*Ondratschek*, 1936), auf welche Weise durch Einrichtung günstiger Vermehrungsbedingungen das Zellgemisch einer bestimmten Art nach wiederholten Übertragungen an Gleichförmigkeit zunimmt, wobei die Vermehrungsintensität ständig im Steigen begriffen ist. Ein Gemisch von Zellen, welche zu fast 100% teilungsfähig sind, bietet in morphologischer Hinsicht vollkommene Homogenität. Nur jene Zellgestalten, welche unter diesen „Normalbedingungen" entstehen, sind für die betreffende systematische Einheit kennzeichnend.

Betrachten wir den ganzen Vermehrungsverlauf eines Zellgemisches, so können wir nach *Czurda* drei Abschnitte unterscheiden, welche durch den jeweiligen Zellzustand gekennzeichnet sind. Der „Normalzustand" findet sich nur in einem verhältnismäßig kurzen Bereich des ansteigenden Astes der Vermehrungskurve, und zwar nur so lange, als sämtliche Zellen noch teilungsfähig sind. Nach Überschreiten dieses Punktes beginnt bereits die „Degenerationsphase", während welcher die Einheitlichkeit des Zellgemisches immer mehr abnimmt. Durch die Verschlechterung der Lebensbedingungen, vor allem infolge des eigenen Stoffwechsels, nimmt die Teilungsintensität ab, die nicht mehr in Teilung begriffenen Zellen verändern ihre Form, es kommt zur Ausbildung verschiedener Zellgestalten, welche oft beträchtlich vom Normalzustand abweichen. Soweit die morphologische Seite der Degeneration. In physiologischer Hinsicht sind Degenerationsstadien besonders durch einen veränderten Stoffwechsel gekennzeichnet, das äußert sich namentlich in einer Anhäufung von Reservestoffen. Darüber hinaus bildet der Verlust der Teilungsfähigkeit ein weiteres Merkmal. Übertragen wir ein derart verändertes Zellgemisch in neue, frische Nährlösung günstiger Zusammensetzung, so tritt „Regeneration" ein, ein physiologischer Vorgang, welcher die Vermehrungsintensität neuerdings ansteigen läßt und damit das bereits degenerierte Zellgemisch in den Normalzustand bringt, falls die Degeneration nicht bereits zu pathologischen Veränderungen geführt hatte. Die „Regenerationsphase" ist ebenso wie die oben geschilderte „Degenerationsphase" durch das gleichzeitige Auftreten uneinheitlicher Zellformen gekennzeichnet.

Die von *Czurda* aufgestellte Forderung nach Zugrundelegung definierter Zellzustände für biologische Arbeiten jeder Art ist von grundlegendster Bedeutung. Die Notwendigkeit der Beachtung des Lebenszustandes eines Organismengemisches ist für alle Zweige der Biologie gegeben. Auch die nachstehenden Versuche stellen einen weiteren Beleg für diese Forderung vor. Es kann hier gezeigt werden, daß der Lebenszustand des untersuchten Zellgemisches von so ausschlaggebender Bedeutung ist, daß seine Nichtbeachtung die Gewinnung physiologisch stichhaltiger Ergebnisse experimenteller Untersuchungen vollkommen vereiteln kann.

Welche Bedeutung dem Lebenszustand eines Versuchsmaterials für den Ausfall eines physiologischen Versuchs zukommt, hat *Czurda* bereits 1933 an Hand von Untersuchungen über die kopulationsauslösenden Bedingungen bei *Conjugaten* aufgezeigt. Hier gestattet überhaupt nur die Verwendung eines im Normalzustand befindlichen Individuengemisches die Auffindung ursächlicher Beziehungen zwischen Lebenszustand und Kopulation. In Degeneration befindliche Zellen sind niemals zur Kopulation befähigt.

Den Einfluß des Zellzustandes auf das Ergebnis ernährungsphysiologischer Untersuchungen konnte ich erstmalig an einer Reihe *mixotropher Flagellaten* und *Algen* zeigen (*Ondratschek*, 1940a, b, c), bei welchen der Einfluß des Lebenszustandes auf das Versuchsergebnis quantitativ erfaßt wurde. In einer eigenen Untersuchung (*Ondratschek*, 1941d) wurden dann die als Voraussetzung für die hier anzustellenden Versuche notwendigen Kenntnisse über die Variabilität der zu untersuchenden *Flagellaten* experimentell erarbeitet. Es wurden die Bedingungen gesucht und gefunden, unter welchen unsere Arten im Normalzustand vorliegen. Die morphologischen Kennzeichen der einzelnen Arten im Normalzustand können aus der genannten Arbeit ersehen werden. Die Bedeutung des Lebenszustandes des zur Beimpfung eines Versuchs verwendeten Zellgemisches für die Menge der unter sonst optimalen Bedingungen gebildeten Trockensubstanz wurde in einigen zusätzlichen Versuchsreihen aufgezeigt.

Diese Versuche wurden hier in erweitertem Rahmen ausgebaut und ergänzt. Als erstes waren die Beziehungen zwischen einer gegebenen Kohlenstoffquelle und dem zu erzielenden Erntehöchstertrag zu klären. Als Kohlenstoffquellen dienten Essigsäure, n-Buttersäure und n-Capronsäure, beimpft wurde mit Zellgemischen im Normalzustand, mit Zellen, die sich in Regeneration befanden, und mit in Degeneration begriffenen Individuen. Das Ergebnis sei an Hand der Tabelle I aufgezeigt.

Tabelle I. Einfluß des Lebenszustandes auf die Höhe des Ernteertrages einiger Flagellaten bei Verwendung verschiedener Monocarbonsäuren als Kohlenstoffquellen.

(Ernteerträge in mg/250 ccm/12 Tage.)

Organismen	Kohlenstoffquellen								
	Essigsäure			n-Buttersäure			n-Capronsäure		
	Lebenszustand des Impfmaterials *								
	N	*R*	*D*	*N*	*R*	*D*	*N*	*R*	*D*
Polytomella agilis	69,3	65,8	31,2	73,4	70,8	35,5	45,8	45,5	18,6
Chilomonas oblonga	99,5	94.3	21,3	115.6	109,6	26,3	56,8	48,5	11,3
Polytoma uvella	121,3	106,2	29,7	123,2	120,0	26,5	68,7	57,3	6,9
Astasia Chattoni	81,2	82,4	80,7	83,5	81,9	76,3	35,3	33,6	32,1

N = Impfmaterial im Normalzustand. *R* = Impfmaterial in Regeneration begriffen. *D* = Impfmaterial degeneriert (bei den einzelnen Organismen in verschieden starkem Maße).

Wie aus Tabelle I ersichtlich ist, hat die Beimpfung eines Versuchs mit in Regeneration begriffenem Zellmaterial nahezu gleich hohe Ernteerträge zur Folge wie bei Einsaat eines Zellgemisches im Normalzustand, vorausgesetzt, daß die zur Verwendung gelangende Nährlösung bezüglich ihrer stofflichen Zusammensetzung und der Reaktion für den untersuchten Organismus günstig ist. Die Beimpfung der gleichen Lösungen mit degenerierten Zellen lieferte in den meisten Fällen bedeutend niedrigere Ernteerträge, deren Größe im einzelnen Falle vom Grad der Degeneration des Impfmaterials abhängt. Eine Ausnahme bildet in obiger Tabelle I *Astasia Chattoni* und in gleicher Weise die übrigen, hier nicht angeführten *Eugleninen*. Wie schon früher (*Ondratschek*, 1941d) auseinandergesetzt wurde, weisen *Eugleninen* hinsichtlich der äußerlich sichtbaren Degenerationsmerkmale Besonderheiten auf, die bei anderen untersuchten *Flagellaten* nicht beobachtet werden konnten. Zellen im Normalzustand unterscheiden sich von solchen der Degenerationsphase nur durch ihre Reservestoffarmut, morphologische Unterschiede bestehen nicht. In den oben besprochenen Versuchen sehen wir ein diesen Befunden entsprechendes Verhalten. und zwar derart, daß die Beimpfung einer Nährlösung mit reservestoffreichen Zellen nur einen um ein geringes niedrigeren Ernteertrag liefert als die Verwendung eines im Normalzustand befindlichen Impfmaterials.

Um die ausschlaggebende Bedeutung des Lebenszustandes für ein Versuchsergebnis noch deutlicher zu veranschaulichen, seien hier einige weitere Versuchsreihen kurz erwähnt. Es wurde eine buttersäurehaltige Nährlösung mit Zellgemischen in verschiedenen Lebenszuständen beimpft und die Ergebnisse der Trockengewichtsbestimmungen mit solchen von essigsäurehaltigen Kulturen verglichen. Veranschaulicht werden die aufgezeigten Verhältnisse durch die in Tabelle II zusammengestellten Zahlen.

Tabelle II. Vergleich der mittels n-Buttersäure bei Verwendung verschieden vorbehandelten Impfmaterials zu erzielenden Ernteerträge. Kontrolle: Nährlösung mit Essigsäure, beimpft mit Zellen im Normalzustand. (Ernteerträge in mg/250 ccm/12 Tage.)

Organismen	Essigsäure	n-Buttersäure		
	Lebenszustand des Impfmaterials			
	im Normalzustand	im Normalzustand	schwach degeneriert	stark degeneriert
Polytomella agilis	70,2	83,6	42,1	0,8
Chilomonas oblonga	102,6	114,8	70,3	1,2
Polytoma uvella	120,0	124,6	82,3	4,7
Astasia Chattoni	81.7	82.7	81.4	76.2

Aus Tabelle II ersehen wir unmittelbar den Zusammenhang zwischen dem Lebenszustand des Impfmaterials und der Erntemenge. Darüber hinaus zeigen die Versuchsergebnisse eindeutig, welche Fehlschlüsse bei der Bewertung verschiedener Kohlenstoffquellen hinsichtlich ihrer Eignung als einzige organische Nährstoffe entstehen können, falls der Lebenszustand des zur Einsaat gelangten Zellgemisches nicht näher untersucht bzw. berücksichtigt wird. So gibt z. B. *Chilomonas oblonga* mit Essigsäure gezüchtet nach 12tägiger Versuchsdauer im genannten Versuch einen Höchstertrag von 102,6 mg Trockensubstanz/250 ccm Nährlösung, mit n-Buttersäure gezüchtet unter den gleichen Bedingungen einen solchen von 114 mg/250 ccm, falls ein im Normalzustand befindliches Impfmaterial verwendet wird. Wird die Buttersäurelösung mit schwach degenerierten Zellen beimpft, während bei den mit Essigsäure angesetzten Versuchen ein im Normalzustand befindliches Zellgemisch zur Einsaat gelangte — was bei zeitlich auseinanderliegenden Versuchen, welche den Lebenszustand nicht beachten, leicht der Fall sein kann —, so würde aus den erhaltenen Trockengewichten der Ernten unfehlbar der Schluß gezogen werden, Buttersäure sei, da sie nur 70,3 mg/250 ccm Trockensubstanz in 12 Tagen liefere, eine um rund 30 % schlechtere Kohlenstoffquelle für *Ch. oblonga* als Essigsäure mit 102,6 mg/250 ccm, während tatsächlich Buttersäure unter Berücksichtigung des Lebenszustandes der Essigsäure deutlich überlegen ist. Wie verhängnisvoll die Verwendung stark degenerierter Zellen zur Beimpfung ernährungsphysiologischer Versuche werden kann, zeigen die in der letzten Zahlenreihe der Tabelle II angeführten Werte. Wir erhalten hierbei nur 1 bis 4 % der Trockensubstanz, welche bei Verwendung von Zellgemischen im Normalzustand erzielt werden.

Sämtliche untersuchten *Euglenineen* (in Tabelle II ist nur *Astasia Chattoni* zur Veranschaulichung angeführt) verhalten sich auch hier wiederum gänzlich anders. Selbst mit Reservestoffen dicht erfüllte, aus mehrere Wochen alten Kulturen entnommene Zellen lieferten nur wenig niedrigere Ernteerträge als Zellen im Normalzustand.

Auf Grund der besprochenen Ergebnisse kann somit auch hier festgestellt werden, daß die Forderung nach Verwendung eines streng definierten Zellgemisches für physiologische Zwecke nicht nur theoretisch berechtigt ist, sondern auch praktisch als unbedingt notwendig nachgewiesen wurde.

Unter Berücksichtigung des ungeheuer verwickelten Zellstoffwechselgeschehens ist ja auch leicht verständlich, daß bereits geringste Änderungen des Lebenszustandes zahlreiche biochemische Umsetzungen beeinflussen müssen, sei es in Form einer einfachen Ablenkung, sei es vollständige Unterbindung einzelner Reaktionsabläufe oder Steigerung

dieser über die Norm hinaus. Wenn wir die morphologische Form und den Reservestoffgehalt als Kennzeichen für den Lebenszustand ansprechen, so geschieht dies nicht etwa deshalb, weil diese Merkmale besonders bedeutsam wären. Sie sind lediglich leicht erkennbare äußere Anzeichen für, im einzelnen einstweilen noch nicht faßbare, Änderungen der empfindlichen chemischen Umsetzungen im Zellinneren.

In einer weiteren Mitteilung dieser Reihe wird an gegebener Stelle aufgezeigt werden, zu welchen Trugschlüssen die Außerachtlassung des Lebenszustandes eines Impfmaterials bei ernährungsphysiologischen Untersuchungen mitunter geführt hat. Für die eigenen Versuchsreihen wird grundsätzlich nur im Normalzustand befindliches Impfmaterial verwendet. Durch laufende, in kurzen Zeitabständen durchgeführte Übertragungen von Zellaufschwemmungen der Stammkulturen konnte dieser Forderung ohne wesentliche Belastung nachgekommen werden.

2. Die Beeinflussung des Zellzustandes und des Ernteertrages durch die Reaktion.

Die Bedeutung der Reaktion für den Verlauf und Ausfall ernährungsphysiologischer Versuche braucht hier nicht näher erläutert zu werden, der oft erfolgsbestimmende Einfluß der H-ionenkonzentration (c_H) ist zur Genüge bekannt. Unter Beachtung dieser Tatsache wurde ihre Rolle für die Vermehrung *heterotropher Flagellaten* wiederholt untersucht, die Angaben über den Lebensbereich verschiedener Arten stimmen bei den meisten Autoren im allgemeinen überein. Mitunter auftretende Unterschiede sind nur von geringer Bedeutung. Weichen die Angaben in einzelnen Punkten stärker voneinander ab, so können diese Befunde so gedeutet werden, daß bei der üblichen Nichtbeachtung des Lebenszustandes Zellgemische vorlagen, welche verschiedene Zellzustände aufwiesen, möglicherweise auch verschiedenen Arten angehörten, wobei der Artunterschied einerseits wegen der geringfügigen Abweichungen, andererseits wegen ähnlicher Degenerationszustände, die sicher vielfach vorlagen, nicht immer erkannt werden konnte.

Hier stehen außer einigen bekannten Arten auch eine Reihe erstmalig beschriebener zur Untersuchung, so daß es notwendig ist, die Beeinflussung des Zellgeschehens durch die Reaktion neuerdings festzustellen.

In einer vorangegangenen Mitteilung (*Ondratschek*, 1941d) wurden die hier zu untersuchenden Arten bezüglich des Einflusses verschiedener Reaktionen einer Nährlösung auf den Zellzustand in morphologischer wie physiologischer Hinsicht bereits behandelt. Infolge der Bedeutung der Befunde für die hier anzustellenden Versuche sollen sie kurz aufgezeigt werden und durch weitere Versuche über den Einfluß der c_H auf die Trockensubstanzproduktion ergänzt werden, wobei vorläufig nur Essigsäure als Kohlenstoffquelle zur Verwendung gelangen soll.

Die Einrichtung bestimmter p_H-Bereiche geschah, nachdem bereits früher (1941d) Versuche mit Phosphatpuffergemischen fehlgeschlagen waren, in der

damals angegebenen Weise durch Zusatz einer wechselnden Anzahl von ccm n/50 HCl oder n/50 NaOH zur Nährlösung. Es ist naturgemäß unmöglich, einen bestimmten Anfangs-p_H-Wert „einzustellen", wie dies in der Literatur oft angegeben wird, es gelingt lediglich durch diese Zusätze einen Wert in der Nähe des angestrebten zu erreichen. Die Unterschiede betragen aber im allgemeinen nicht mehr als $\pm$ 0,25 p_H im Durchschnitt, und infolge dieser verhältnismäßig geringen Abweichungen vom angestrebten Idealwert bestehen keine Bedenken gegen die Verwendung derart abweichender Lösungen.

Aus den recht umfangreichen Ergebnissen der obengenannten Untersuchung (*Ondratschek*, 1941d) seien hier nur jene hervorgehoben, welche für die im Rahmen dieser Arbeit zu untersuchenden Fragen von Bedeutung sind. Sie werden ergänzt durch einige neue quantitative Befunde über die Beeinflussung der Erntemenge durch den p_H-Wert.

A. Cryptomonaden.

Untersucht wurden Zellgemische, deren Heranzüchtung in Acetatnährlösungen mit folgenden Anfangsreaktionen erfolgte: p_H 5,2, 5,8, 6,2, 6,5 und 7,2. Die laufend durchgeführte mikroskopische Überprüfung des Zellaussehens zeigte, daß bei allen untersuchten Arten der Normalzustand in einer Lösung mit p_H 6,5 am 4. bis 6. Tag nach Beimpfung erreicht wurde. Eine Lösung mit p_H 6,2 zeigte nur geringe Verschiedenheiten, bei p_H 5,8 degenerierten hingegen die eingetragenen Zellen bereits nach einigen Teilungen, wobei die Vermehrungsgeschwindigkeit rasch absank. Eine Reaktion von p_H 7,2 hatte schließlich sehr starke Degenerationserscheinungen zur Folge. Die quantitativ durchgeführten Versuche über die Beeinflussung des Ernteertrages durch die Reaktion ergaben ein den oben aufgezeigten Befunden entsprechendes Bild. Einige Ergebnisse meiner Bestimmungen sind in Tabelle III zusammengestellt. Die Zahlen bedeuten Mittelwerte aus mehreren Bestimmungen.

Tabelle III. Einfluß der Reaktion auf die Trockensubstanzbildung einiger *Chilomonaden*.

(Trockengewicht in mg/250 ccm/12 Tage.)

Arten	p_H 5,8	p_H 6,5	p_H 7,2
Chilomonas paramaecium	81,2	106,9	53,4
Ch. oblonga	90,1	101,5	40,8
Ch. coniformis	82,7	98,8	32,5
Ch. longata	64,3	97,5	26,6
Ch. globosa	56,6	102,3	36,9

Es ergibt sich somit, daß ein p_H von 6,5 für alle fünf untersuchten *Chilomonas*-Arten die günstigste Reaktion darstellt sowohl was die rasche Erreichung des Normalzustandes betrifft als auch bezüglich der maximalen Erntemenge.

B. *Volvocalen.*

a) Polyblepharidineen. Die hier angestellten Versuche ergaben in Verbindung mit den früher durchgeführten (1941d) im allgemeinen ähnliche Befunde, wie sie bei den *Chilomonaden* besprochen wurden. Eine Reaktion von p_H 6,5 ist in allen Fällen am günstigsten, sämtliche Zellen stehen bei dieser Reaktion in reger Vermehrung und sind durchwegs im Normalzustand befindlich. p_H 6,2 unterscheidet sich bezüglich seines physiologischen Einflusses nicht von p_H 6,5, p_H 5,8 hingegen verursacht bei *Polytomella globosa* bereits starke Degeneration, während *P. agilis* und *P. caeca* noch annähernd im Normalzustand verbleiben. p_H 7,2 führt in allen Fällen sehr rasch zu starken Degenerationserscheinungen. Die Ergebnisse der hier angestellten Trockengewichtsbestimmungen seien auszugsweise in Tabelle IV wiedergegeben.

Tabelle IV. Einfluß der Reaktion auf die Trockensubstanzbildung einiger *Polyblepharidineen*.
(Trockengewicht in mg/250 ccm/12 Tage.)

Arten	p_H 5,8	p_H 6,5	p_H 7,2
Polytomella agilis	69,6	71,0	46,2
P. caeca	59,3	72,2	55,0
P. globosa	36.5	68.5	53.1

b) Chlamydomonadineen. Die Versuche zeigten bezüglich der für das Wachstum einzelner *Polytoma*-Arten optimalen Reaktion ziemliche Verschiedenheiten. Unter Berücksichtigung gewisser gemeinsamer Merkmale können jedoch die untersuchten 14 *Polytoma*-Arten in folgende Einteilung gebracht werden:

1. Optimaler p_H-Bereich um p_H 7,5, gute Vermehrung zwischen p_H 6,8 und 7,8: *P. uvella, P. majus. P. minus, P. coniforme, P. dorsiventrale, P. cylindraceum* und *P. tetraolcare.*
2. Optimaler p_H-Bereich um p_H 7,0, gute Vermehrung zwischen p_H 6,5 und 7,5: *P. Pascheri, P. obtusum* und *P. caudatum.*
3. Optimaler p_H-Bereich um p_H 6,5, gute Vermehrung zwischen p_H 5,8 und 6,8: *P. ocellatum, P. angustum, P. curvatum* und *P. papillatum.*

Die mikroskopische Untersuchung des Lebenszustandes der unter den verschiedenen Versuchsbedingungen erhaltenen Zellgemische zeigte, daß bei Gruppe I (Optimum p_H 7,5) der Normalzustand zwischen p_H 7,0 und 7,8 nach einigen Übertragungen des Zellgemisches sicher eintrat, auch wenn stärker degenerierte Zellen zur Beimpfung verwendet wurden. Zwischen p_H 6,5 und 6,8 fanden sich leichte Degenerationsstadien, jenseits von p_H 7,8 oft irreversibel degenerierte Zellen. Bei Gruppe II

(Optimum p_H 7,0) liegt der Sachverhalt ganz ähnlich. Zwischen p_H 6,5 und 7,5 herrscht der Normalzustand vor, jenseits des unteren Wertes leichte Degeneration, jenseits des oberen Wertes starke Degeneration. Gruppe III (Optimum p_H 6,5) weicht davon etwas ab. Auch Reaktionen außerhalb des optimalen Bereiches (auf der sauren Seite) können das eingeimpfte Zellgemisch in einer dem Normalzustand ähnlichen Beschaffenheit erhalten, jedoch ist die Vermehrung gering. Ein p_H über 7,0 erzeugt stärkere Degenerationserscheinungen. Zellen, welche bei p_H 7,5 oder 7,8 eingesetzt wurden, degenerierten irreversibel.

Die neuerdings durchgeführten Trockengewichtsbestimmungen ergaben ein gleichsinniges Verhalten. Auch hier können wir die drei genannten Gruppen feststellen, innerhalb welcher die gleichen physiologischen Verhältnisse in bezug auf die optimale Reaktion herrschen. Die wesentlichsten Befunde werden in nachstehender Tabelle V wiedergegeben.

Tabelle V. Einfluß der Reaktion auf die Trockensubstanzbildung einiger *Polytomeen*.

(Trockengewicht in mg/250 ccm/12 Tage.)

Arten			
I. Gruppe:	p_H 6,5	p_H 7,5	p_H 8,3
Polytoma uvella	62,4	120,3	78,9
P. majus	32,1	100,9	21,2
P. minus	34,4	82,3	30,9
P. coniforme	30,2	99,3	41,7
P. dorsiventrale	63,4	97,8	46,4
P. cylindraceum	40,8	126,1	62,8
P. tetraoleare	43,2	98,6	26,3
II. Gruppe:	p_H 5,8	p_H 7,0	p_H 7,9
P. Pascheri	19,5	103,8	56,0
P. obtusum	97,7	122,9	87,7
P. caudatum	18,3	105,9	47,6
III. Gruppe:	p_H 5,8	p_H 6,5	p_H 7,5
P. ocellatum	117,7	150,8	123,2
P. angustum	81,9	101,4	64,3
P. curvatum	44,4	79,7	46,5
P. papillatum	11,4	117,9	53,8

C. Eugleninen.

Züchtungsversuche mit den hier zur Untersuchung stehenden *Euglena*- und *Astasia*-Arten bei verschiedener Reaktion der Nährlösung ergaben in allen Fällen eine geringe Beeinflußbarkeit des Lebenszustandes durch die Reaktion. Wie bereits oben festgestellt wurde, unterscheiden sich *Eugleninen* bezüglich ihrer Formenvariabilität wesentlich von allen anderen bisher untersuchten Arten. Während bei

anderen systematischen Einheiten in der Regel Zellen im Normalzustand von degenerierten verhältnismäßig leicht zu unterscheiden sind, ändert sich bei *Eugleninen* die Zellform im Laufe der Degeneration nicht, nur der Grad des Reservestoffgehalts bietet einen Hinweis auf den physiologischen Zustand der Zelle. In Übereinstimmung damit konnte auch bei den hier angestellten Versuchen festgestellt werden, daß zwar eine Lösung mit p_H 6,5 durchschnittlich reservestofffreie Zellen entstehen läßt, daß jedoch mit zunehmender Alkalität lediglich die Reservestoffe im Innern der Zellen zunehmen, ohne daß die Zellform beeinflußt wird. Wird die Reaktion nach der sauren Seite hin verschoben, dann tritt eine als „Hungerdegeneration" bekannte Erscheinung ein.

Für die Höhe des Erntetrockengewichts ist jedoch die Reaktion der zur Züchtung verwendeten Lösung von wesentlicher Bedeutung, wie aus der Tabelle VI zu ersehen ist. Eine Reaktion um p_H 6,5 wirkt bei allen untersuchten Arten am günstigsten. *Euglena gracilis var. robusta* und *Astasia longa* vermehren sich auch bei p_H 6,0 sehr gut, *A. quartana* ebenso bei p_H 7,0. Im allgemeinen muß festgestellt werden, daß das p_H-Optimum für die hier untersuchten *Euglena*- und *Astasia*-Arten ziemlich eng begrenzt ist. Wie aus Tabelle VI zu ersehen ist, haben verhältnismäßig geringe Reaktionsverschiebungen bereits einen sehr ungünstigen Einfluß auf die Trockensubstanzbildung.

Tabelle VI. Einfluß der Reaktion auf die Trockensubstanzbildung einiger *Eugleninen*.

(Trockengewicht in mg/250 ccm/12 Tage.)

Arten	p_H 5,6	p_H 6,0	p_H 6,6	p_H 7,1	p_H 7,6
Euglena viridis	6,5	22,3	**52,1**	28,6	17,5
E. gracilis	18,8	35,1	**63,8**	37,2	22,7
E. gracilis var. robusta	37,6	**75 8**	**81,1**	57,3	23,8
Astasia longa	37,9	**76,5**	**80,9**	52,7	12,0
A. quartana	16,9	45,6	**68,2**	**66,8**	21,0
A. Chattoni	11.2	32.7	**78.9**	64.3	28.2

3. Das Wirkstoffbedürfnis heterotropher Flagellaten.

Die Frage nach der „Stimulierung" der Vermehrung und des Wachstums durch die verschiedenartigsten Stoffe hat seit jeher das Augenmerk der auf diesem Gebiet tätigen Autoren auf sich gezogen. Bis zur jüngsten Zeit wurden vielfach Stoffe auf ihre Wirkung hin geprüft, deren chemische Zusammensetzung nicht bekannt war. So wurden die verschiedensten organischen Erzeugnisse, wie Bierwürze oder Hefeautolysat, oder Organextrakte, wie Leberextrakt, und Früchteabkochungen verwendet. Die mitunter erzielte positive Beeinflussung der Vermehrung oder des Wachstums wurde mit sehr unbestimmten Begriffen bezeichnet, wie „stimulierend", „anregend", „wachstumsfördernd",

„vermehrungsanregend", „ertragssteigernd" und ähnlichen Wortbildungen. Auf die Unzweckmäßigkeit dieses Gebrauchs wird später noch eingegangen werden.

Erst die Fortschritte der Chemie in der Synthetisierung gewisser organischer Verbindungen haben es ermöglicht, mit reinsten, zum Teil synthetisch hergestellten, vor allem aber in ihrer chemischen Struktur genau bekannten Wirkstoffpräparaten — besonders mit Vitaminen — an die Untersuchung der Wirkung einer Reihe von Faktoren herantreten zu können, die teils eine bedeutende Steigerung der Trockensubstanzbildung, teils aber überhaupt erst die Auswertung chemisch einfach gebauter Energie- und Baustoffquellen durch die verschiedenen Mikroorganismen ermöglichen.

Neben zahlreichen Untersuchungen an *Bakterien* (*Knight*, 1933ff.) hat vor allem *Schopfer* (1932ff.) an verschiedenen *Pilzen*, insbesondere an *Phycomyces*, und *Nielsen* (1930ff.) an *Hefe* und *Aspergillus* wichtige Feststellungen über die Rolle der Vermehrungsfaktoren („Wuchsstoffe") in der Ernährungsphysiologie dieser Organismen getroffen. Eine sehr übersichtliche Zusammenstellung der bisherigen Befunde auf dem Gebiet der Wirkstofforschung, welche auch Einzelheiten unsere *Flagellaten* betreffend enthält, hat *Schopfer* (1939) gegeben, eine weitere, nach anderen Gesichtspunkten zusammengestellte Übersicht veröffentlichte *Janke* (1939). Beide Arbeiten lassen ein näheres Eingehen auf die bisherigen Mitteilungen, soweit sie nicht unmittelbar in den engeren Bereich unserer Fragestellung fallen, an dieser Stelle unnötig erscheinen.

Vor einer näheren Betrachtung jener Wirkstoffe, welche für die hier zur Untersuchung stehenden Mikroorganismen lebenswichtig sind, haben wir uns mit der Möglichkeit einer Gliederung der unter den Begriff „Wirkstoffe" fallenden Substanzen zu beschäftigen. *Schopfer* (1939, S. 17) gab eine solche, der ich mich voll anschließe, und derzufolge wir alle Wirkstoffe in folgendes System bringen können:

Wirkstoffe.

Pseudowachstumsfaktoren:	Stoffe anorganischer Natur.
Wachstumsfaktoren:	Substanzen vitaminischer Natur, greifen in den Stoffwechsel ein, wirken u. a. auf die Assimilierbarkeit der Nährstoffe und den Plasmawuchs.
Wuchsstoffe:	Stoffe hormonartiger Natur, beeinflussen letzten Endes auf spezifische Weise die Formbildung.

Die vorliegende Anzahl der bisherigen Untersuchungen beschäftigte sich mit zur zweiten Gruppe gehörenden Stoffen, also mit Wachstumsfaktoren im engeren Sinn, über deren Bedeutung für das Zellgeschehen bei *Algen* jedoch noch wenig bekannt ist. Der Verfasser konnte in einer Reihe von Mitteilungen (*Ondratschek*, 1940a, b, c) den Einfluß einiger Wirkstoffe, wie Ascorbinsäure (Vitamin C) und Aneurin (Vitamin B_1) auf die Vermehrung mixotropher *Grünalgen* nachweisen. Ascorbinsäure stellt eine vermehrungsfördernde Substanz namentlich bei Ernährung mit Kohlensäure und anorganischen Substanzen dar, Aneurin beeinflußt hingegen die Auswertung organischer Kohlenstoff- und Stickstoffquellen in besonderem Maße. Die optimale Konzentration liegt im allgemeinen mit 100 γ/100 ccm Nährlösung höher, als dies z. B. bei *Pilzen* der Fall ist.

Es konnte ferner aufgezeigt werden, daß die Vermehrung der untersuchten Organismen allein von dem zur Verfügung stehenden Wirkstoff beeinflußt wird, wenn alle Nährstoffe im Optimum vorhanden sind. Ein neuerliches Ansteigen der Vermehrungskurve ist nur durch zusätzliche Beigabe des infolge des Verbrauchs ins Minimum geratenen Wirkstoffs zu erzielen.

Es zeigte sich aber auch, daß verschiedene mixotrophe *Algen* keines der gebotenen Vitamine bedurften, sie vermehrten sich in einer vitaminfreien Nährlösung ebenso gut wie in einer wirkstoffhaltigen. Wie nun bereits *Schopfer* (1939) auf Grund von Versuchen an *Pilzen* ausführte, kann das Wirkstoffbedürfnis als Zeichen eines Verlustes der Fähigkeit zur Selbstbildung des betreffenden Wachstumsfaktors aufgefaßt werden. Es gelang mir zu zeigen, daß das Vitaminbedürfnis gewisser *Hormidium*-Arten tatsächlich auf den Verlust der Synthesefähigkeit zurückgeführt werden kann. Ein Zusatz von Extrakten vitamin-nichtbedürftiger Arten zu Kulturen vitamin-bedürftiger Stämme hatte die gleiche ertragssteigernde Wirkung zur Folge wie ein Zusatz synthetischer Vitamine, während Zusätze von Extrakten vitamin-bedürftiger Stämme keinerlei vermehrungsfördernde Wirkung haben.

In der genannten Mitteilung habe ich bereits eingehend die Notwendigkeit einer schärferen sprachlichen Fassung des Einflusses von Wirkstoffen dargelegt. In den eigenen Arbeiten wird nach folgender Regel verfahren, deren allgemeine Anwendung vorgeschlagen wurde:

1. Ist ein Wirkstoff unumgänglich für die Vermehrung notwendig, so daß in seiner Abwesenheit in einer sonst optimalen Nährlösung keine Vermehrung eintritt, darf nur der Begriff „Wachstumsfaktor" (im engeren Sinne) gebraucht werden.

2. Falls der zu untersuchende Stoff eine an sich zwar vorhandene, jedoch geringe Vermehrung bedeutend steigert, also nach dem bisherigen Gebrauch einen Wachstumsfaktor „im weiteren Sinne" darstellt, wird seine Wirkung mit „vermehrungsanregend" oder „ertragssteigernd" bezeichnet. Ersteren Begriff wende ich in Fällen an, wo der Vermehrungsverlauf durch Bestimmung der Zellenzahl in der Volumeneinheit erfolgt, letzteren bei Untersuchungen, welche den Wirkstoffeinfluß quantitativ an der erzeugten Trockensubstanzmenge feststellen.

Der Ausdruck „wachstumsfördernd" hat nur dann seine Berechtigung, wenn tatsächlich eine Zunahme des Wachstums, also der irreversiblen Volumenzunahme der *einzelnen Zelle* festgestellt wird.

Wie gleichfalls bereits früher auseinandergesetzt wurde, soll mit dieser scharfen sprachlichen Trennung keine physiologische Unterschiedlichkeit festgelegt werden. Nach dem vorhin Gesagten ist die Möglichkeit zur stufenweisen Rückbildung eines Synthesevermögens gegeben.

Der Einfluß chemisch definierter Wirkstoffe auf die Vermehrung *heterotropher Algen*, sowie deren Bedeutung als Wachstumsfaktoren oder nur als „ertragssteigernde" Stoffe wurde bereits in vorversuchsartiger Weise von *Lwoff* und seinen Mitarbeitern (1935ff.) untersucht. Leider teilen die Autoren ihre Ergebnisse nur in Form sehr kurzer, oft nicht zwei Seiten umfassender Mitteilungen mit, die infolge der Kürze jegliche Einzelheiten vermissen lassen. Obwohl die Neuartigkeit und Einmaligkeit der Ergebnisse offenkundig war, sind für die Nachprüfung wichtige Angaben, wie Zusammensetzung der Nährlösungen, Reaktion, Impfweise, Aneurinkonzentration u. a. m. nur höchst

unvollkommen oder meist überhaupt nicht vorhanden. Ebenso fehlen jegliche Angaben über die Größenordnung der Ertragssteigerung. Die Verfasser geben lediglich an, daß Aneurin bzw. dessen Bestandteile Thiazol und Pyrimidin oder auch nur einer von beiden für den bestimmten Organismus lebensnotwendig ist und begnügen sich mit dieser Feststellung. Über die wirksame Konzentration des Aneurins findet sich nur eine vereinzelte Angabe, daß nämlich *Polytomella caeca* noch mit 10^{-9} N (?) ihr Auskommen findet. Welche Konzentration optimal wirkt und welche Menge bei den einzelnen Versuchen zur Lösung zugesetzt wurde, bleibt unbekannt.

In Anbetracht der überragenden Bedeutung des Wirkstoffproblems für die Ernährungsphysiologie erschien es daher unbedingt notwendig, das Wirkstoffbedürfnis *heterotropher Flagellaten* eingehend zu untersuchen. In der Hauptsache wurden die Ergebnisse dieser Untersuchungen bereits in einer Reihe von Mitteilungen veröffentlicht (*Ondratschek*, 1940d, 1941a, b, c, d), so daß hier nur wenige Ergänzungen notwendig waren. Nachstehend sollen die wesentlichsten Befunde der genannten Arbeiten, ergänzt durch neue Befunde, kurz besprochen werden.

Anfängliche, mit *Chilomonas paramaecium* durchgeführte Versuche zeigten, daß Aneurin bereits in geringen Dosen die mit organischen Kohlenstoff- und Stickstoffquellen erzielten Ernteerträge um das 80- bis 100fache zu steigern imstande ist. Mit Hilfe dieses Wirkstoffs kann *Ch. paramaecium* auch anorganischen Stickstoff voll auswerten. Die Bestimmung der optimalen Aneurinkonzentration ergab einen Zusatz von 1 γ Aneurin auf 100 ccm Nährlösung als besonders wirksam. Höhere Konzentrationen haben keine weitere Ertragssteigerung zur Folge, mit fallenden Aneurinmengen nehmen die Erträge ab, doch ist die Wirkung noch bei einer Verdünnung von $1 : 10^{-12}$ feststellbar.

Weitere Versuche haben gezeigt, daß Aneurin durch eine Mischung seiner beiden Komponenten Thiazol und Pyrimidin ersetzt werden kann, Pyrimidin allein hat keinen Einfluß, Thiazol wohl eine gewisse ertragssteigernde Wirkung, doch bleibt der erzielte Ertrag hinter dem mit Aneurin hervorgebrachten um rund die Hälfte zurück.

Die Versuche mit *Ch. paramaecium* hatten die Voraussetzung für die Untersuchung des Wirkstoffbedürfnisses weiterer Arten gegeben. Als nächstes erfolgte die Prüfung von vier weiteren *Chilomonaden* (*Ch. longata*, *Ch. globosa*, *Ch. oblonga* und *Ch. coniformis*), sowie von drei *Polyblepharidineen* (*Polytomella agilis*, *P. caeca* und *P. globosa*). Auch hier konnte auf Grund der Analyse des Aneurineinflusses gezeigt werden, daß dieses einen unbedingt lebenswichtigen Wachstumsfaktor vorstellt. Bezüglich der optimalen Konzentration zeigten sich hier kleine Verschiedenheiten unter den einzelnen Arten. Während *Ch. paramaecium* ein ausgesprochenes Optimum bei 10^{-6}% Aneurin aufwies, lieferte *Ch. oblonga* bei Konzentrationen zwischen 10^{-5} und 10^{-7}% nahezu die gleichen Ernteerträge, *Ch. longata* nur zwischen 10^{-5} und

10^{-6}%, während *Ch. globosa* und besonders *Ch. coniformis* wiederum ein ausgesprochenes Optimum bei 10^{-6}% Aneurin haben. Die drei *Polytomella*-Arten liefern gleichfalls mit 10^{-6}% Aneurin die größten Erträge, während jedoch eine Konzentrationsverminderung bei *P. caeca* ein sofortiges Absinken der Erträge herbeiführt, bleiben die Ernten von *P. globosa* und *P. agilis* auch bei vermindertem Aneuringehalt die gleichen.

Aneurin kann in seiner Wirkung durch ein Pyrimidin-Thiazolgemisch vollständig ersetzt werden, Thiazol allein genügt den Ansprüchen der *Chilomonas*-Arten zu rund 50 %, bei den *Polyblephyridineen* erweist es sich allein als unwirksam. Pyrimidin schließlich blieb in allen Fällen unwirksam. *Chilomonas* hat also mit anderen Worten die Fähigkeit zur Bildung von Thiazol vollständig, zur Synthese von Pyrimidin zumindest teilweise eingebüßt, während *Polytomella* zu keiner der beiden Synthesen befähigt ist.

Es erfolgte im Anschluß die Untersuchung einer Reihe von *Polytomeen*. Insgesamt 14 Arten, von denen einige bereits in dieser Hinsicht von anderen Autoren behandelt worden waren, wurden auf ihr Wirkstoffbedürfnis hin untersucht.

Pringsheim (1937) hatte bereits die Notwendigkeit von „Glucosekaramel" für *P. uvella* behauptet, während *Lwoff* und *Dusi* (1937) den Einfluß von Aneurin und seiner Komponenten auf die Vermehrung einiger *Polytoma*-Arten untersuchten. Ihr Ergebnis ist kurz zusammengefaßt folgendes: *P. uvella* und *P. obtusum* sind in ihrer Vermehrung von Aneurin unabhängig, *P. ocellatum* und *P. caudatum* besitzen die Fähigkeit zur Bildung von Pyrimidin, benötigen hingegen Thiazol. Diese Ergebnisse wurden jedoch zumindest teilweise mit Asparagin als Stickstoffquelle gewonnen, soweit dies aus den spärlichen Angaben der Versuchsbedingungen ersichtlich ist und wie ich wiederholt (1940d, 1941a, b, c) gezeigt habe, besitzt selbst ein als „purrissimum" bezeichnetes Präparat einen genügend großen Wirkstoffgehalt, um die Vermehrung von gewissen *Flagellaten* — allerdings nicht allen — zu ermöglichen. Die Angaben von *Lwoff* und *Dusi* waren somit einer Nachprüfung und Neubearbeitung zu unterziehen. Ein Wirkstoffbedürfnis ist nach meiner Ansicht erst dann eindeutig nachzuweisen, wenn mit möglichst einfach zusammengesetzten, chemisch besonders gereinigten und *geprüften* Präparaten an die Untersuchung herangetreten wird. Auf den „Wuchsstoff" *Pringsheims* (Glucosekaramel) wird aus diesen Gründen hier nicht näher eingegangen. Untersuchungen mit Stoffen, deren chemische Zusammensetzung nicht nur unklar, sondern infolge der Herstellungsweise niemals konstant ist, können keine eindeutigen Ergebnisse hervorbringen.

Die Untersuchung des Wirkstoffbedürfnisses der *Polytomeen* stieß zunächst auf große Schwierigkeiten. Bestimmte Stämme zeigten ein sehr starkes Abweichen vom sonstigen Verhalten. Erst nach der Feststellung des Zinkbedarfs einiger Arten konnte dann gezeigt werden, daß Aneurin für alle untersuchten *Polytoma*-Arten die Bedeutung eines Wachstumsfaktors besitzt. Die optimale Dosis schwankt be-

Tabelle VII. **Wirkstoffgehalt organischer Stickstoffquellen, Ertragsfaktoren und optimale Aneurinkonzentration.**
(Zusammengestellt aus den Mitteilungen: *Ondratschek*, 1940d, 1941a, b, c.)

Arten	Ertragsfaktoren						Aneurinoptimum in %
	Asparagin			Pepton-*Vaillant*		Ammonnitrat	
	t. r.*	ch. r.*	p.*	u. b.*	m. C.*		
Chilomonas paramaecium	1,77	12,3	78,2	1,04	52,5	82,1	10^{-6}
Ch. oblonga	2,36	15,2	95,2	1,06	85,0	115,0	10^{-6}
Ch. longata	1,89	10,3	107,1	1,02	75,6	121,5	10^{-6}
Ch. globosa	3,05	12,9	90,8	1,04	76,1	113,1	10^{-6}
Ch. coniformis	1,92	13,5	94,4	1,01	50,6	137,9	10^{-6}
Polytomella caeca	2,65	16,9	108,7	1,02	65,8	110,4	10^{-6}
P. agilis	2,32	18,2	90,8	1,03	64,3	118,8	10^{-6}
P. globosa	3,12	22,1	111,3	1,01	56,3	139,7	10^{-6}
Polytoma uvella	6,70	27,1	96,9	1,06	55,5	111,0	10^{-8}
P. ocellatum	4,85	26,0	105,8	1,04	59,5	115,2	10^{-6}
P. angustum	6,77	27,2	100,9	1,02	50,5	111,2	10^{-5}
P. curvatum	5,87	26,8	104,0	1,05	43,4	110,0	10^{-8}
P. majus	6,73	30,5	111,0	1,04	54,7	116,2	10^{-6}
P. Pascheri	6,84	30,1	92,9	1,02	64,9	93,8	10^{-6}
P. minus	5,95	28,8	118,3	1,05	50,1	99,3	10^{-4}
P. obtusum	7,92	27,7	92,1	1,04	54,0	105,8	10^{-8}
P. coniforme	7,80	28,9	104,0	1,03	52,8	113,9	10^{-5}
P. caudatum	7,66	29,3	105,4	1,06	51,7	108,2	10^{-6}
P. tetraoleare	8,55	28,1	91,0	1,02	54,2	95,4	10^{-8}
P. dorsiventrale	8,08	27,7	97,2	1,02	53,0	127,1	10^{-6}
P. cylindraceum	8,32	29,2	102,6	1,03	53,2	100,2	10^{-6}
P. papillatum	8,04	29,0	98,6	1,04	57,3	105,1	10^{-4}
Euglena viridis	1,89	20,6	111,6	1,03	60,0	125,6	10^{-5}
E. gracilis	1,25	16,5	97,6	1,01	59,3	119,8	10^{-4}
E. gracilis var. robusta	1,65	10,9	94,7	1,00	62,3	127,8	10^{-6}
Astasia longa	2,53	21,3	98,1	1,04	66,8	133,3	10^{-4}
A. quartana	2,06	20,5	93,4	1,04	59,2	131,1	10^{-4}
A. Chattoni	2,46	18,9	98,2	1,03	63,3	126,7	10^{-4}

* t. r. = technisch rein, ch. r. = chemisch rein, p. = purissimum, 3mal umkristallisiert; u. b. = unbehandelt, m. C. = mit Carboraffin ausgeschüttelt.

trächtlich, die jeweils günstigste Konzentration kann aus der folgenden Tabelle VII entnommen werden.

Weitere Versuche zeigten, daß Aneurin in 13 von 14 Fällen durch eine Mischung seiner beiden Komponenten ersetzt werden kann, lediglich *P. minus* verlangt das vollständige Aneurinmolekül. Thiazol hat in einigen Fällen eine ziemliche ertragssteigernde Wirkung (*P. uvella*, *P. ocellatum*, *P. obtusum*), in anderen Fällen hat es nahezu die gleiche Wirkung wie Aneurin (*P. curvatum*, *P. caudatum*), in weiteren Fällen weist es überhaupt keine Wirkung auf (*P. majus*, *P. minus*). Pyrimidin ist für *P. curvatum* ebenso günstig wie Aneurin, für *P. obtusum* halb so gut, in den anderen Fällen ist die Wirkung mehr oder minder gering.

Wie aus der genannten Arbeit (*Ondratschek*, 1941 b) entnommen werden kann, ist die Fähigkeit zur Synthese von Aneurin bzw. dessen Bestandteilen bei den einzelnen *Polytoma*-Arten in ganz verschiedener Weise und in verschiedenem Grade verlorengegangen.

Hier muß noch zu einigen Widersprüchen der Ergebnisse *Lwoffs* zu den eigenen Stellung genommen werden. *Lwoff* behauptet die Unabhängigkeit von *Polytoma uvella* und *P. obtusum* von Aneurin. Die Versuche wurden mit 0,4 % Asparagin als Stickstoffquelle durchgeführt. Wie ich bereits früher zeigen konnte, bieten aber bereits 0,2 % Asparagin genügend Wirkstoffe, um diesen beiden Arten Vermehrung zu ermöglichen (s. auch Tabelle VII). Dieser Widerspruch erklärt sich somit aus dem Wirkstoffgehalt des von *Lwoff* verwendeten Asparaginpräparats. *Lwoff* stellte ferner fest, daß *P. ocellatum* und *P. caudatum* mit Thiazol allein ihr Auslangen finden können. Die eigenen Versuche haben das im *allgemeinen* bestätigen können, da *Lwoff* aber keine quantitativen Bestimmungen durchgeführt hat, ist es ihm entgangen, daß Thiazol in seiner Wirkung immerhin beträchtlich hinter der des vollständigen Aneurinmoleküls zurückbleibt. Eigene Versuche mit Thiazol ergaben Vermehrungsfaktoren von $f = 52{,}8$ für *P. ocellatum* und $f = 86{,}8$ für *P. caudatum*, während bei Anwendung von Aneurin die gleichen Faktoren $f = 107{,}0$ und $f = 102{,}6$ betragen. In beiden Fällen ist also Aneurin dem Thiazol deutlich überlegen und muß daher mit Recht als *der* Wachstumsfaktor für beide Arten bezeichnet werden.

In ähnlicher Weise wie bei *Polytomeen* ist auch die Vermehrung von *Eugleninen* in synthetischer Nährlösung an das Vorhandensein von Zink gebunden. In seiner Gegenwart stellt Aneurin einen Wachstumsfaktor für alle untersuchten Arten vor. Seine optimale Konzentration beträgt zwischen 10^{-4} und 10^{-6} %. Näheres ist aus der Tabelle VIII zu entnehmen.

Aneurin ist für die *Euglena*-Arten sowohl durch ein Gemisch seiner Bausteine, als auch durch Thiazol allein voll wirksam zu ersetzen, während Pyrimidin allein wirkungslos ist. Die *Astasia*-Arten kommen gleichfalls mit Pyrimidin + Thiazol ebensogut aus wie mit dem vollständigen Aneurinmolekül, mit Thiazol allein liefern sie hingegen nur rund 50 % der normalen Erntemenge. Pyrimidin allein ist unwirksam.

Wie aus den besprochenen Untersuchungsergebnissen eindeutig ersichtlich ist, besitzt Aneurin für alle geprüften *heterotrophen Flagellaten* (bis jetzt 28 Arten) maßgebliche Bedeutung. Abgesehen von zufällig als Verunreinigung organischer Substanzen anwesenden Wirkstoffen ist Aneurin in jedem Falle lebensnotwendig, also nach der Definition ein „Wachstumsfaktor“ im engeren Sinne, ohne dessen Vorhandensein keine Vermehrung möglich ist.

Tabelle VIII. Ertragsfaktoren für Aneurin und seine Komponenten.
(Zusammengestellt nach *Ondratschek*, 1940/41.)

Arten	Aneurin	Thiazol + Pyrimidin	Thiazol	Pyrimidin
Chilomonas paramaecium	98,7	99,3	51,4	7,8
Ch. oblonga	101,3	99,8	46,7	3,6
Ch. longata	108,2	102,4	52,0	5,9
Ch. globosa	100,6	98,6	39,5	4,0
Ch. coniformis	122,6	119,8	49,8	6,9
Polytomella caeca	128,0	129,1	1,2	1,5
P. agilis	110,8	108,6	1,4	0,9
P. globosa	110,2	112,5	1,0	1,6
Polytoma uvella	105,1	104.1	49,4	8,8
P. ocellatum	107,0	105.2	52,8	7,0
P. angustum	93,8	90,3	14,5	11,6
P. curvatum	89,1	83,5	77,6	79,0
P. majus	88,6	75,7	1,8	1,5
P. Pascheri	100,9	101,3	28,9	21,5
P. minus	106,2	54,1	2,8	3,0
P. obtusum	98,6	101,4	63,2	58,1
P. coniforme	93,2	90,7	21,4	11,1
P. caudatum	102,6	99,5	86,8	13,4
P. tetraoleare	102,8	96,6	23,9	1,4
P. dorsiventrale	96,4	90,6	35,0	6,3
P. cylindraceum	92,4	85,6	46,6	10,8
P. papillatum	100,5	72,0	17,7	3,1
Euglena viridis	100,2	97,8	91,6	5,6
E. gracilis	118,8	120,6	117,2	4,8
E. grac. var. robusta	117,9	116,9	112,1	4,6
Astasia longa	115,7	119,3	59,4	1,7
A. quartana	137,0	130,6	65,0	2,0
A. Chattoni	109,9	104,0	57,9	2,0

In Tabelle VII, S. 343, sind einige Zahlen wiedergegeben, welche einerseits die Wirkung des Aneurins auf die Trockensubstanzbildung zeigen, andererseits die optimale Aneurinkonzentration angeben. Einige zahlenmäßige Vergleiche der Aneurinwirkung mit der eines Thiazol-Pyrimidingemisches bzw. der beiden Stoffe für sich sollen diesen Abschnitt beschließen (Tabelle VIII).

Zur Kennzeichnung der Verhältnisse werden in den nachstehenden Tabellen nicht die Ergebnisse der Trockengewichtsbestimmungen direkt angegeben, sondern die aus ihnen berechneten Ertragsfaktoren:

$$f = \frac{\text{Trockengewicht der aneurinhaltigen Kultur}}{\text{Trockengewicht der aneurinfreien Kultur}}$$

weil diese Zahlen eine bessere Vergleichsmöglichkeit gewährleisten, wie bereits früher auseinandergesetzt wurde.

4. Das Mineralsalzbedürfnis heterotropher Flagellaten.

In Zusammenhang mit der Untersuchung des Wirkstoffbedürfnisses *heterotropher Flagellaten* (*Ondratschek*, 1940d, 1941a, b, c) konnte der Verfasser die ersten vorläufigen Feststellungen über den Mineralsalzbedarf der untersuchten Arten treffen. Gleichzeitig wurde auch die für eine maximale Trockensubstanzbildung günstigste Konzentration der notwendigen anorganischen Nährsalze bestimmt. Im Laufe der Versuche ergab sich ferner die Notwendigkeit zur Beachtung des Bedürfnisses an Spurenelementen, so daß schließlich die Notwendigkeit zu einer eingehenden Untersuchung des Mineralsalzbedarfes gegeben war. Dieses Vorhaben wurde in einer eigenen Mitteilung (*Ondratschek*, 1941e) verwirklicht. Es wurde hierbei vornehmlich der Bedarf an anorganischen Nährstoffen untersucht und der Bedeutung der Spurenelemente nur soweit Beachtung geschenkt, als diese nicht in Form von Verunreinigungen bereits in der Nährlösung vorhanden waren. Letztere Frage wird hier einer näheren Analyse unterzogen.

Solange unsere Kenntnisse über die eigentliche Wirkung der als „Spurenelemente" bezeichneten Stoffe noch gering sind, ist es nicht empfehlenswert, zwischen Nähr- und Spurenelementen einen grundsätzlichen Unterschied zu machen. Derzeit ist eine Entscheidung darüber, ob die nur in sehr geringer Konzentration notwendigen Elemente zur Gruppe der Wirkstoffe (Pseudowachstumsfaktoren nach *Schopfer*) zu rechnen sind, unmöglich. Es scheint zweckmäßiger, vornächst die Konzentration eines lebensnotwendigen Elements für die Verwendung in dieser oder jener Beziehung nicht zu sehr zu betonen. Wenn auch weiterhin die üblichen Begriffe „Nährelemente" und „Spurenelemente" angewendet werden, so geschieht dies nur im üblichen Sprachgebrauch und soll lediglich sagen, daß für eine reichliche Vermehrung erstere in viel stärkerer Konzentration vorhanden sein müssen als letztere.

Den Ansprüchen *heterotropher Flagellaten* an anorganischen Nährstoffen war man bisher stets so nachgekommen, daß in ziemlich willkürlicher Weise die von Kulturversuchen bei höheren Pflanzen bekannten Mineralstoffe zur Nährlösung zugesetzt wurden. Vielfach scheint man sich auch auf die zufällige, in Form von Verunreinigungen gegebene Anwesenheit gewisser anorganischer Stoffe verlassen zu haben, was daraus hervorgeht, daß in verschiedenen älteren Arbeiten (z. B. *Pringsheim*, 1921) lediglich K_2HPO_4 und $MgSO_4$ zugesetzt wurde. Ca, Fe und — falls notwendig — Spurenelemente mußten dann zwangsläufig bei positivem Ausfall des Züchtungsversuchs aus den genannten Verbindungen oder Nährsalzen stammen.

In der oben erwähnten Arbeit (*Ondratschek*, 1941e) wurden sämtliche anorganischen Nährelemente auf ihre Lebensnotwendigkeit hin

untersucht und erstmalig festgestellt, welche Mengen die Vermehrung und Trockensubstanzbildung am günstigsten beeinflussen.

Die Angabe der Zusammensetzung einer Nährlösung erfolgt aus Gründen, die in der ersten Mitteilung bereits eingehend besprochen worden sind, in einer Form, welche nur das tatsächlich notwendige Nährelement berücksichtigt. So wird z. B. der Phosphatgehalt einer Nährlösung nicht mehr wie bisher üblich in % Na_2HPO_4, sondern in % P als Na_2HPO_4.

Es wurden nun experimentelle Untersuchungen angestellt, bei welchen, ausgehend von einer Nährlösung in der bisher üblichen Form, von der die Gewißheit bestand, daß sie allen zu untersuchenden *Flagellaten* günstigste Lebensbedingungen bot, schrittweise ein Element um das andere in seiner Konzentration verändert wurde.

Einzelheiten über diese Untersuchungen können in der genannten Arbeit nachgelesen werden. Ihre Ergebnisse ermöglichten die Zusammenstellung einer Nährlösung nach den neuen Gesichtspunkten, die sich in allen Fällen als günstig erwiesen hat und auch in dieser Arbeitenreihe grundsätzlich verwendet wird. Die genaue Zusammensetzung wurde bereits bei der Besprechung der Art der Versuchsanstellung in der ersten Mitteilung dieser Reihe gegeben.

Nach der Untersuchung der übrigen als „Nährelemente" bezeichneten Stoffe konnte dann das Bedürfnis der *Flagellaten* an Elementen näher betrachtet werden, welche wegen der geringen Mengen, die lebensnotwendig sind, als „Spurenelemente" bezeichnet werden. Auf technische Einzelheiten braucht hier nicht eingegangen zu werden. Es sei nur festgestellt, daß nach langwierigen Vorversuchen aufgezeigt werden konnte, daß Zusätze von Zn, Mn und As eine Lösung, die wegen der vorausgegangenen sorgfältigen Reinigung von Spurenelementen keine Vermehrung *heterotropher Flagellaten* zuläßt, zur Züchtung brauchbar machen. Weitere Versuche zeigten die jeweils günstigste Konzentration dieser Spurenelemente auf. Es sei aber ausdrücklich betont, daß damit weder absolut gültige Werte gegeben sein sollen, noch ein Anspruch auf Vollständigkeit erhoben werden kann. Es besteht immerhin die Möglichkeit, daß Elemente, die in noch geringerer Verdünnung wirksam sind, bei der Reinigung der Lösungen nicht erfaßt wurden.

Nachstehend sei eine Zusammenstellung der für die Vermehrung der hier zur Untersuchung stehenden *Flagellaten* notwendigen Spurenelemente sowie ihre günstigste Konzentration wiedergegeben (Tabelle IX). Die gemachten Angaben beziehen sich nur auf die in meinen Versuchsreihen gegebenen Bedingungen.

Tabelle IX. Zusammenstellung der für die Vermehrung heterotropher Flagellaten notwendigen Spurenelemente, sowie ihre günstigste Konzentration.

(Nach *Ondratschek*, 1941e.)

Arten	Zink in %	Mangan in %	Arsen in %
Chilomonas paramaecium	10^{-5}	10^{-6}	nicht notwendig
Ch. oblonga	10^{-5}	10^{-6}	„ „
Ch. coniformis	10^{-5}	10^{-6}	„ „
Ch. longata	10^{-5}	10^{-6}	„ „
Ch. globosa	10^{-5}	10^{-6}	„ „
Polytomella agilis	10^{-5}	10^{-8}	„ „
P. caeca	10^{-5}	10^{-8}	„ „
P. globosa	10^{-5}	10^{-8}	„ „
Polytoma uvella	10^{-5}	10^{-10}	„ „
P. minus	10^{-5}	10^{-8}	„ „
P. obtusum	10^{-6}	10^{-10}	„ „
P. majus	10^{-5}	10^{-8}	„ „
P. angustum	10^{-6}	10^{-10}	„ „
P. caudatum	10^{-6}	10^{-8}	„ „
P. papillatum	10^{-6}	10^{-10}	„ „
P. cylindraceum	10^{-5}	10^{-8}	„ „
P. ocellatum	10^{-6}	10^{-9}	„ „
P. tetraoleare	10^{-5}	10^{-10}	„ „
P. Pascheri	10^{-5}	10^{-10}	„ „
P. coniforma	10^{-6}	10^{-8}	„ „
P. dorsiventrale	10^{-6}	10^{-10}	10^{-11}
P. curvatum	10^{-6}	10^{-8}	10^{-11}
Euglena viridis	10^{-5}	10^{-8}	10^{-10}
E. gracilis	10^{-5}	10^{-8}	10^{-10}
E. grac. var. robusta	10^{-6}	10^{-8}	nicht notwendig
Astasia longa	10^{-5}	10^{-8}	10^{-11}
A. quartana	10^{-5}	10^{-8}	10^{-10}
A. Chattoni	10^{-6}	10^{-8}	10^{-10}

5. Bedeutung der Reaktion für die Auswertbarkeit verschiedener Kohlenstoffquellen, Beeinflussung der Trockensubstanzbildung durch die Konzentration der Kohlenstoffquelle.

Bei der Erörterung der obigen, für die weiteren Versuche besonders bedeutsamen Fragen müssen teilweise Ergebnisse herangezogen werden, die erst in einer folgenden Mitteilung näher besprochen werden können. Aus Gründen der Zweckmäßigkeit, namentlich um nicht bei der Besprechung jeder einzelnen Kohlenstoffquelle neuerdings auf die Bedeutung der Reaktion und der C-Konzentration eingehen zu müssen und auch, weil die Ergebnisse dieser Untersuchungen ein ziemlich gleichartiges Bild darstellen, soll hier die vorliegende Frage für sämtliche Kohlenstoffquellen behandelt werden.

Wie einleitend aufgezeigt werden konnte, hatte ich bereits früher jene Reaktionsbereiche festgestellt, welche bei Züchtung mit Essigsäure

als Kohlenstoffquelle üppige Vermehrung ermöglichen. Weitere Versuche haben dann gezeigt, daß diese Werte auch für alle übrigen näher untersuchten Kohlenstoffquellen als optimal zu gelten haben. Dies war von vornherein nicht als unbedingt sicher anzunehmen. Es hätte an sich die Möglichkeit bestanden, daß z. B. mit steigender Zahl der Kohlenstoffatome im Molekül auch eine Verschiebung des p_H-Optimums nach der sauren oder alkalischen Seite stattfinden könnte. Die Erklärung wäre dann so gewesen, daß die den C-Komplex angreifenden Fermente verschiedenes Reaktionsoptima gehabt hätten. Ich konnte aber feststellen, daß in allen Fällen die für Essigsäure als besonders günstig festgestellten Reaktionen auch für andere Kohlenstoffquellen zutreffen, was den Schluß erlaubt, daß die Art des biochemischen Abbaus der Kohlenstoffquellen nach einer einheitlichen Richtung erfolgt.

Nachstehend soll dieses Verhalten an einigen Beispielen kurz aufgezeigt werden, wobei auf die Wiedergabe umfangreicher Versuchsergebnisse verzichtet werden kann, da sich, wie bereits angeführt, keine wesentlichen Unterschiede gezeigt haben. Zur Veranschaulichung seien Vertreter aus jeder systematischen Gruppe ausgewählt, die das gleiche p_H-Optimum haben. Folgende Arten sollen zu diesem Zwecke verwendet werden: *Chilomonas paramaecium*, *Polytomella caeca*, *Polytoma ocellatum* und *Astasia longa*, alle mit einem optimalen p_H von 6,5. An Hand einiger Kohlenstoffquellen sei das Verhalten aufgezeigt (Tabelle X).

In ähnlicher Weise wie hier geschildert verhielten sich sämtliche Arten, und zwar bei Züchtung mit anderen verwertbaren Kohlenstoffquellen. Es ist damit festgestellt, daß die für Essigsäure als optimal aufgezeigten Reaktionen auch für alle anderen hier geprüften Kohlenstoffquellen ihre Gültigkeit haben.

Tabelle X. Einfluß der Reaktion auf die Auswertbarkeit einiger Kohlenstoffquellen.

Angabe der Ertragsfaktoren (f_C).

	Essigsäure			n-Buttersäure			n-Capronsäure		
	p_H 5,8	p_H 6,5	p_H 7,2	p_H 5,6	p_H 6,5	p_H 7,3	p_H 5,8	p_H 6,5	p_H 7,5
Chilomonas paramaecium	81,2	100,0	53,4	85,1	119,9	55,2	75,9	99,8	48,2
Polytomella caeca	87,0	100,0	57,8	89,2	132,7	62,8	42,9	68,3	24,1
Polytoma ocellatum ..	78,5	100,0	81,2	82,3	112,8	101,6	60,8	98,8	75,7
Astasia longa .	82,9	100,0	68,7	97,3	125,8	85,6	81,1	99,9	53,5

Ein weiterer Punkt, der zweckmäßig hier vorweggenommen werden soll, ist die Frage nach der günstigsten Konzentration der Kohlenstoff-

quelle. Wie wir an Essigsäure näher aufzeigen werden, kommt einer Konzentration von 50 mg C/100 ccm der günstigste Einfluß auf den Ernteertrag zu. Ähnliche Versuche wurden auch mit anderen Kohlenstoffquellen angestellt, wobei ich mich besonders mit Monocarbonsäuren befaßte. Durchwegs erwies sich ein Gehalt von 50 mg C/100 ccm Lösung als sehr günstig. Das gleiche Verhalten konnte dann auch für Alkohole und einige andere Stoffe, wie Milchsäure, Brenztraubensäure, Glycerinaldehyd und Dioxyaceton nachgewiesen werden. Wegen der völligen Gleichartigkeit der Ergebnisse erübrigt sich hier eine auch nur auszugsweise Wiedergabe. Bei der Besprechung der Essigsäure werden einige Zusammenstellungen gegeben, welche in ähnlicher Weise für alle anderen Kohlenstoffquellen gelten.

Eine weitere Frage, die gleichfalls hier erörtert werden soll, ist die nach der toxischen Konzentration der Kohlenstoffquelle. Bis zu *Provasoli* (1937) wurden willkürlich Konzentrationen von meist 0,2 % angewendet, *Provasoli* hat dann aufgezeigt, daß verschiedene der bisherigen negativen Ergebnisse auf diese mitunter bereits giftige Konzentration zurückzuführen sind. Er setzte seine Konzentrationen wesentlich herab, ohne aber eine Regel hierbei zu finden. Wie meine Versuche zeigen, besteht eine gewisse Gesetzmäßigkeit zwar insofern, als bei sämtlichen Kohlenstoffquellen eine Konzentration von 50 mg C pro 100 ccm Lösung optimal ist, d. h. mit anderen Worten, daß mit steigender Kohlenstoffzahl im Molekül die optimale Molekülkonzentration der betreffenden Kohlenstoffquelle immer geringer wird.

Es erschien ferner notwendig, auch jeweils jene Konzentration zu bestimmen, bei welcher eingetragene Zellen sich nicht mehr teilen bzw. nach 24 Stunden absterben. Es wurden verschiedene Versuche angestellt, welche wiederum ein ziemlich gleichartiges Verhalten aller untersuchten Organismen zeigten. Das Ergebnis war folgendes: mit

Tabelle XI. Toxische Konzentrationen der Kohlenstoffquellen.

Kohlenstoffquellen	Anzahl der C Atome	Toxische Konzentration in mg C/100 ccm
Stoffe mit gerader C-Anzahl	2	nicht bestimmbar
	4	100
	6	90
	8	80
	10	70
	12	60
Stoffe mit ungerader C-Anzahl	3	90
	5	80
	7	70
	9	60
Stoffe mit iso-Bindung	2	70
	4	60

steigender Kohlenstoffzahl nimmt die Toxizität ziemlich gesetzmäßig zu, wobei drei physiologische Reihen unterschieden werden können, wie Tabelle XI zeigt.

Iso-Verbindungen mit mehr als 6 Atomen C im Molekül werden in keinem Falle verwertet, ebenso sind iso-Verbindungen mit ungerader C-Anzahl nicht assimilierbar.

Zusammenfassung.

Die vorliegende Arbeit bringt eine Reihe von experimentellen Untersuchungen zur Darstellung, deren Ergebnisse erst die Durchführung der geplanten stoffwechselphysiologischen Untersuchungen ermöglichen.

Die Bedeutung des physiologischen Zustandes wurde klargelegt, der ertragsbestimmende Einfluß der Reaktion aufgezeichnet. Die bisher bekannten Tatsachen über das Wirkstoffbedürfnis *heterotropher Flagellaten* wurden zusammengestellt und durch eigene Befunde ergänzt. Die zur Ernährung nötigen anorganischen Elemente wurden in quantitativen Versuchen gesucht und gefunden. Versuche über die Bedeutung der Reaktion für die Auswertbarkeit verschiedener Nährstoffquellen sowie über die Beeinflussung der Trockensubstanzbildung durch die Konzentration der Kohlenstoffquellen und deren Toxizität schlossen die Vorversuche ab.

Auf Grund der besprochenen Ergebnisse erfolgt jetzt die Untersuchung der Kohlenstoffernährung der hier behandelten *Flagellaten*, deren Besprechung einer weiteren Mitteilung vorbehalten bleibt.

Eine Literaturübersicht wird in der letzten Mitteilung dieser Arbeitsreihe gegeben.

(Aus dem Institut für Mikrobiologie Rostock.)

Die Erblichkeit der durch Radiumbestrahlung bei der Hefe ausgelösten Riesenzellbildung.

Von

R. Bauch.

Mit 8 Textabbildungen.

(Eingegangen am 21. Juli 1943.)

Die Größe der Zellen in einer *Hefe*-Kultur folgt den für alle Organismen geltenden Gesetzen der Variabilität. So findet man in jeder *Hefe*-Kultur kleine, mittlere und extremgroße Zellen. Über die zahlenmäßige Verteilung dieser drei Zellsorten orientieren variationsstatistische

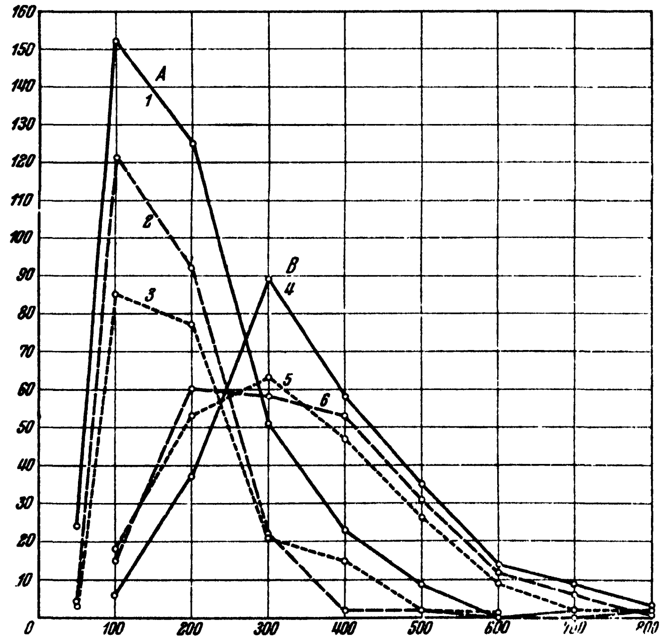


Abb. 1. Kurven der Volumina verschiedener Auswertungsserien von Klon 1.
A. Bei Kultur auf Bierwürzeagar.
B. Bei Kultur in flüssiger Bierwürze.

Auswertungen, bei denen Umrißzeichnungen der Zellen (mit Zeichenapparat bei stärkster Vergrößerung entworfen) in ihren Durchmessern ausgemessen, die Volumina der Einzelzellen rechnerisch bestimmt und die Einzelvolumina kurvenmäßig unter Zugrundelegung einer Klassen-

einteilung von je 100 Volumenwerten (z. B. alle Zellen mit Werten von 51 bis 150 gehören der Klasse 100 an) zusammengestellt werden. Die Variationskurven verschiedener Ausmessungen der Zellvolumina auf dem gleichen Bierwürzeagar zeigen einen recht übereinstimmenden Verlauf der Gesamtkurven und identische Lagen der Kurvengipfel (Abb. 1A). Die errechneten Zahlenwerte sind innerhalb der durch die Meßmethodik gebotenen Fehlerquellen als identisch zu bezeichnen (Tabelle I). Der Anfangspunkt dieser Kurven gibt die Größe der eben abgeschnürten Tochterzellen an, ihre Gipfelpunkte stellen die Größe der heranwachsenden Zellen dar und ihr Ende zeigt die von den Zellen unter diesen Bedingungen überhaupt erreichbare Größe an. Das Ausmaß der Größe dieser extremen Plusabweicher wechselt von Fall zu Fall etwas.

Tabelle I. Zahlenwerte zu den Variationskurven der Abb. 1 und 2.

	Mittelwert $M \pm m$	Streuung σ	Anzahl der Zellen n
Abb. 1. A Kurve 1	183,7 ± 5,9	117,3	386
„ 2	163,1 ± 5,6	87,0	244
„ 3	186,3 ± 7,2	103,0	205
B „ 4	368,5 ± 9,5	150,7	251
„ 5	325,0 ± 8,9	132,0	220
„ 6	338,1 ± 9,1	139,6	236
Abb. 2. Stammwürze, konz.	369,6 ± 11,5	172,3	226
„ 1 : 3	215,3 ± 7,4	117,4	249
„ 1 : 6	196,0 ± 7,0	110,7	235

Voraussetzung für eine vergleichende Auswertung derartiger Kurven ist naturgemäß die Innehaltung der gleichen Außenbedingungen. In Flüssigkeitskulturen, z. B. in Stammwürzelösungen von 10° Balling, verschieben sich die Mittelwerte etwa um das Doppelte gegenüber Agarkulturen und die Lage der extremen Plusabweicher folgt dieser Verschiebung in etwa dem gleichen Verhältnis (Abb. 1B). Dies dürfte ein Ausdruck der in einer Flüssigkeitskultur naturgemäß gegebenen besseren Ernährungsverhältnisse der Einzelzellen gegenüber einer Kultur auf festem Nährboden sein, wo der Einzelzelle nur geringe Nährstoffmengen zur Verfügung stehen. Wieweit die Menge der Nährstoffe die Größe der Zellen beeinflußt, wird aus der Abb. 2 ersichtlich, in der eine variationsstatistische Auswertung der Zellengröße in einer verschieden verdünnten Stammwürzelösung vorgenommen wurde. Die Gigasrassen verhalten sich entsprechend.

Bei derartigen Auswertungen stößt man gelegentlich auf die Tatsache, daß einzelne Zellen unvermittelt höhere Volumenwerte zeigen und manchmal weit über das Ende der gewohnten Plusabweicher

hinausgreifen können. Man bezeichnet diese Extremformen für gewöhnlich als Riesenzellen und man kennt sie wohl von allen *Hefe*-Arten. In den Lehrbüchern der Gärungsphysiologie finden sie eine meist nur recht kurze Erwähnung und über die Ursachen und Bedingungen ihrer Entstehung ist nicht allzuviel bekannt. Die Frage, ob diese Riesenzellen überhaupt fortpflanzungsfähig sind und dabei ihre Größe auf die Nachkommen vererben oder ob sie wieder den Normaltypus liefern,

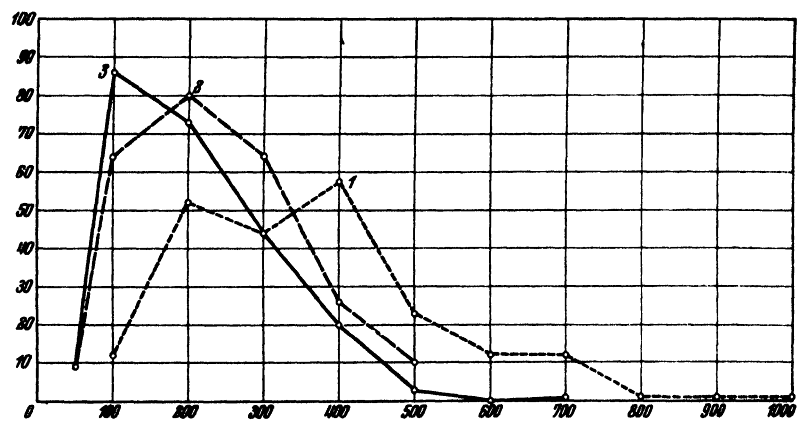


Abb. 2. Volumenkurven von Klon 1 bei Kultur in verschieden verdünnter Bierwürze.
1. in Stammwürze,
2. in mit Wasser 1 : 3 verdünnter Stammwürze,
3. in mit Wasser 1 : 6 verdünnter Stammwürze.

ist m. W. noch kaum angeschnitten worden. In der Sprache der Genetik würde diese Frage lauten: „Stellen die Riesenzellen nichterbliche, phänotypische Modifikationen dar oder handelt es sich bei ihnen um genotypische erbliche Veränderungen ?“ Aus der allgemeinen Praxis der Hefezüchtung heraus ergeben sich aber gewisse Anhaltspunkte, daß es sich hierbei um nichterbliche Modifikationen handelt. Denn im anderen Falle müßte es ja möglich sein, aus jeder Riesenzellen aufweisenden Kultur Rassen mit größeren Volumenwerten herauszuzüchten. Erfahrungen dieser Art liegen anscheinend in der gärungsphysiologischen Literatur nirgends vor und auch der zu meinen Versuchen benutzte Klon einer *Brauerei-Betriebshefe* hat bei laufender, vielfacher Überwachung innerhalb eines Zeitraumes von 2 Jahren nie spontan „Riesenrassen“ geliefert.

Die Frage über die genetische Struktur der Riesenzellen ist theoretisch besonders wichtig im Hinblick auf die Gigasrassen, die sich durch Behandlung der *Hefe* mit bestimmten chemischen Stoffen gewinnen lassen [*Bauch*, 1942 (1) (2)]. Bei diesen Gigasrassen handelt es sich um Formen, die in ihrer Zellgröße teilweise um das Doppelte und

Vierfache verändert sind und die diesen Riesenwuchs auf die Nachkommenschaft übertragen. Man darf diese Gigasrassen mit einem hohen Maß von Wahrscheinlichkeit als genotypische Veränderungen, also Mutationen, auffassen, bei denen die Größenzunahme wahrscheinlich auf einer Vermehrung des Chromosomenbestandes beruht. Die Stoffe, mit denen sich die Bildung derartiger Gigasrassen auslösen läßt, gehören zu den Wirkungsgruppen der polyploidisierenden Substanzen, den krebserregenden Stoffen und den pflanzlichen Wuchsstoffen von Heteroauxincharakter. Von allen drei Stoffgruppen ist bekannt, daß sie entweder an der tierischen oder pflanzlichen Zelle Veränderungen der Chromosomenzahl durch Einwirkung bei der Zellteilung auszulösen vermögen.

Der Genetik ist es möglich, Erbänderungen in besonders reichem Umfang durch Bestrahlung mit Röntgen- oder Radiumstrahlen und mit ultraviolettem Licht auszulösen. Es treten dabei sehr verschiedene Arten von Mutationen auf: 1. Genmutationen, bei denen nur ein einzelner Erbfaktor verändert ist, 2. Chromosomenmutationen, bei denen Einzelchromosomen in ihrer Struktur verändert sind, 3. Genommutationen, bei denen die Zahl der Chromosomen Abweichungen zeigt. Dementsprechend sollte man erwarten, daß Bestrahlung von *Hefe* ebenfalls zum Auftreten neuer Rassen führt.

Bekanntlich hat *Nadson* (zusammenfassende Darstellungen 1933 und 1937) mit verschiedenen Mitarbeitern durch Bestrahlung von Hefe mit Radiumemanation verschiedene neue Rassen gewinnen können und auch bei anderen Pilzen sich konstant erhaltende Veränderungen hervorgerufen. Seine Versuche sind in Frankreich besonders von *Lacassagne* (1939) an *Hefe* und von *Metalnikoff* mit Mitarbeitern (1939 und 1940) bei *Bakterien* mit positivem Erfolg weitergeführt worden, und es ist der Versuch unternommen worden, die Entstehung solcher Radiumrassen auch für technische Zwecke verwertbar zu gestalten. Ein sehr umfangreiches Material über die Entstehung von Mutationen bei *Ascomyceten* der Gattung *Sordaria* durch Röntgenbestrahlung hat neuerdings *Greis* (1941) vorgelegt.

Der Frage des Auftretens von neuen Größenvarianten der *Hefe* ist dabei verhältnismäßig wenig Aufmerksamkeit geschenkt worden.

Nadson berichtet von seiner Rasse C, entstanden durch Behandlung mit Radiumemanation, aus der *Brennereihefe XII*, daß sie sehr polymorph sei und daß „Riesengroße hier eine gewöhnliche und charakteristische Erscheinung" sei, ohne aber anzugeben, ob die Zellengröße allgemein erhöht sei. Nur *Lacassagne*, *Schoen* und *Béraud* (1939) geben kurz an, durch Radiumbestrahlung bei *Saccharomyces ellipsoideus Chambertin* Rassen erhalten zu haben, die sich durch ihre Größe von der Ausgangsrasse unterscheiden und stellen eine ausführliche Schilderung der Morphologie ihrer Radiumrassen in Aussicht. Bei *Aspergillus niger* hat *Whelden* (1940) durch Bestrahlung mit Kathodenstrahlen niederer Spannung eine Rasse als „Sektormutante" gewonnen, die sich durch vergrößerte Mycelzellen, vergrößerte Konidien und schnelleres Wachstum von der Ausgangsrasse unterscheidet. Ihren Charakter als polyploide Gigasrasse konnte

er durch Zählung der Chromosomen sicherstellen. Daß gelegentlich bei den Pilzen ebenso wie bei den Blütenpflanzen spontan polyploide Gigasrassen auftreten können, machen die Beobachtungen von *Sörgel* (1936) an *Allomyces Kniepii* höchstwahrscheinlich. Im Zusammenhang mit den reichen Erfahrungen der Strahlengenetik an anderen Objekten müssen wir auch für die Hefe damit rechnen, daß Bestrahlung neben Abweichungen anderer Art die Bildung von Gigasrassen auslösen kann.

Die aufgeworfene Fragestellung nach der genetischen Natur der Riesenzellen und der experimentellen Auslösung von Gigasrassen erhält aber von einer ganz anders orientierten Forschungsrichtung eine wesentlich veränderte Beleuchtung. Die Strahlenbiologie hat seit langem die *Hefe* als leicht zu handhabendes Versuchsobjekt benutzt, um die Schädigung einer Zelle durch die Bestrahlung festzustellen. Bei den Versuchen, eine Abtötung der *Hefe* durch Bestrahlung durchzuführen, stellte sich heraus, daß bei mittleren Strahlendosen nie sämtliche Zellen gleichmäßig abgetötet werden, sondern daß immer nur eine bestimmte Zellenzahl von der Schädigung betroffen wird. Die dabei gewonnenen „Schädigungskurven" verlaufen exponentiell und diese Unstetigkeit der Strahlenwirkung wird von der Strahlenphysik auf die korpuskulare, quantenhafte Natur der Strahlung zurückgeführt. Die Abtötung selbst wird dabei als ein Effekt eines „Treffers" eines Strahlenquants auf ein Steuerungszentrum, vor allem den Kern, angesehen (*Jordan*, 1938).

Für unsere Gedankengänge interessiert aus diesen biophysikalischen Untersuchungen und den daraus sich ergebenden, für unsere Auffassung des belebten Organismus höchst wichtigen theoretischen Schlußfolgerungen nur eine Beobachtung, die mehr am Rande der dort diskutierten Fragen liegt. Als Primärfolge einer Bestrahlung der *Hefe* kommt es zu einer leichten Hypertrophie aller Zellen, bedingt durch Änderungen der Plasmapermeabilität (*Nadson*, 1922 und 1925). Neuerdings schätzen *v. Euler, Ahlström* und *Högberg* (1942) das Ausmaß dieser Vergrößerung auf etwa 30 % des Zellvolumens. Außerdem findet sich in bestrahlten Hefekulturen immer eine mehr oder minder große Anzahl von Zellen von ausgesprochenem Riesenwuchs.

Nadson hat wohl als erster im Jahre 1922 auf diese Riesenzellen infolge einer Radiumbestrahlung hingewiesen und sie für *Bierhefe, Nadsonia fulvescens, Rosahefe* und *Endomyces vernalis* beschrieben. Bei einer Nachuntersuchung fanden *Kotzareff* und *Chodat* (1923) bei Behandlung von *Bierhefe* mit Radiumemanation Riesenzellen mit einem Durchmesser von im Mittel 13,3 μ gegen 8 μ der Normalzellen. Derartige Riesenzellen sind immer wieder bei strahlenbiologischen Untersuchungen an *Hefen* und anderen *Pilzen* aufgefallen. Sie sind beobachtet worden von *Holweck* und *Lacassagne* (1930) bei *Sacch. ellipsoideus Chambertin* nach Röntgenbestrahlung, von *Erdmann* (1934) bei der *Bierhefe* nach Röntgenbestrahlung, von *Oster* (1934) bei Bierhefe und von *Schreiber* (1939) bei *Sacch. turbidans* nach ultravioletter Bestrahlung, von *Motida* und *Adati* (1939) bei *Sacch. ellipsoideus II* nach Röntgenbestrahlung und von *Beutin* (1941) bei *Torula*-Arten aus *Bäckereihefe* nach Röntgenbestrahlung. Daß es

sich hierbei nicht um eine besondere Reaktion der *Hefen* und verwandter *Pilze*, sondern um eine allgemeine zellphysiologische Reaktionsweise handelt, zeigen entsprechende Befunde bei anderen Organismen. So berichten *Lea, Haines* und *Coulson* (1936) über Riesenzellen bei *Bakterien* nach γ-Bestrahlung, und *Luria* (1939) nach Behandlung mit α- und Röntgenstrahlen. Gleiche Beobachtungen liegen auch für *Infusorien, Flagellaten* (*Lacassagne*, 1934) und für Algen [*Mesotaenium* (*Forssberg*, 1933), *Zygnema* (*Petrová*, 1936), *Chlorella* (*Pietschmann*, 1937)] vor. Diese Riesenzellen sind aber in sehr verschiedenem Maße durch die Bestrahlung geschädigt. Manche Zellen können sich trotz ihrer physiologischen Aktivität überhaupt nicht weiter vermehren. Sie sind in ihrer Teilungsfähigkeit irreversibel geschädigt, obgleich sie, wie ihre Wachstumsfähigkeit erweist, nicht völlig abgetötet sind. Andere haben in mehr oder minder großem Ausmaße ihre Teilungsfähigkeit erhalten und bilden Kleinkolonien von sehr verschiedener Größe. *Lacassagne* (1934) führt diese differenten Schädigungen der Vermehrungsfähigkeit auf Treffereignisse an einzelnen Zellbestandteilen, dem Teilungszentrum oder Einzelteilen der chromatischen Substanz oder des Cytoplasmas zurück.

Die genetische Seite dieser als Bestrahlungsfolge auftretenden Riesenzellen ist von der Strahlenbiologie nur andeutungsweise gestreift worden. Im Hinblick auf die Synthese von Gigasrassen der *Hefen* durch chemische Stoffe mußte die Frage nach der Erblichkeit dieser Riesenzellbildungen besonderes Interesse erwecken. Denn wenn auch aus den vorher geschilderten Untersuchungen über die Entstehung von neuen Heferassen nach Radiumbehandlung erbliche Änderungen mit Sicherheit anzunehmen sind, so spielen doch in den bisher veröffentlichten Beobachtungen Riesenrassen eine ganz untergeordnete Rolle. Dies ist besonders auffällig, weil die Riesenzellen anscheinend in recht erheblicher Menge nach einer Bestrahlung gebildet werden. Um über diese Frage ein eigenes Urteil zu gewinnen, wurden deshalb bereits im Dezember 1941 größere Versuchsserien mit Radiumbestrahlung durchgeführt, die im Frühjahr 1942 im wesentlichen abgeschlossen waren. Weitere Versuchsserien, die nur einer Überprüfung vorher erhaltener Teilergebnisse dienten, gelangten im Winter 1943 zur Ausführung.

Zur Methodik der Bestrahlungsversuche sei kurz folgendes gesagt: Von jungen, in lebhafter Sprossung befindlichen Bierwürzekulturen der *Hefe* — benutzt wurde vor allem der auch für die Auslösung der Gigasrassen verwendete Klon einer *Brauereibetriebshefe*, ferner die obergärige *Frohberghefe* des Instituts für Gärungsgewerbe, Berlin, und je ein haploider und diploider Stamm einer von *Winge*, Kopenhagen, freundlichst überlassenen *Preßhefekultur* — wurden auf Deckgläschen zwei Reihen von Tröpfchenkulturen in einem Abstande von etwa 5 mm angelegt. Auf der Oberseite des Deckglases wurden die üblichen röhrenförmigen Radiumelemente von 10 mg möglichst zentriert zwischen beide Tropfenreihen angeordnet und durch Vaselintropfen in ihrer Lage fixiert. Die Bestrahlungsdauer wurden zwischen 1 und 9 Tagen variiert. Da quantitative Auswertungen nicht beabsichtigt waren, wurde auf eine Feststellung der zeitlichen Grenzwerte des Strahlungseffektes verzichtet. Die getroffene Versuchsanordnung ermöglichte sowohl die direkte Beobachtung der durch die Be-

strahlung hervorgerufenen Zellveränderungen, gestattete aber auch, Plattenaussaaten zur Überprüfung des weiteren Verhaltens der einzelnen Zellen anzulegen.

Für die Überlassung der benötigten Radiummengen bin ich den Herren Prof. *Lehmann*, Chirurgische Universitätsklinik, und Prof. *Haselhorst*, Universitätsfrauenklinik Rostock, zu verbindlichem Dank verpflichtet.

Die Reaktion aller verwendeten Hefestämme auf die Bestrahlung war in allen wesentlichen Punkten gleichartig. Schon nach 24stündiger Bestrahlung findet man in den Tröpfchenkulturen eine ganze Anzahl von toten Zellen, deren Protoplast kontrahiert ist. Etwa gleich häufig sind Zellen, bei denen die Schädigung unter dem Bilde der Plasmoptyse verläuft. Die Zellmembran ist meist an einer Schmalseite der Zelle aufgeplatzt und das Plasma anscheinend unter Druck nach außen getreten, wo es noch längere Zeit als Gerinnsel erkennbar bleibt. Über derartige Plasmoptysen berichten auch *Schreiber* (1934) nach ultravioletter Bestrahlung von *Sacch. turbidans* und *Motida* und *Adati* (1939) nach Röntgenbestrahlung von *Sacch. ellipsoideus*. Bei längerer Bestrahlungsdauer fallen gelegentlich wesentlich vergrößerte Zellen vom Riesenzellcharakter auf. Die Überimpfung der bestrahlten Hefen auf Bierwürzeagarplatten läßt die Differenzen des Strahlungseinflusses auf die einzelnen Zellen wesentlich schärfer als in den Tröpfchenkulturen hervortreten. Auf diesen Aussaaten entwickeln sich neben Normalkolonien von gewohnter Zellgröße die von den genannten Autoren beschriebenen Kleinkolonien mit vergrößerten Zellen. Diese Kleinkolonien, die ja auch für die chemisch beeinflußte *Hefe* charakteristisch sind, treten hier in überraschend großer Zahl auf. Gegenüber der chemischen Behandlung unterscheiden sie sich aber durch ihre sehr verschiedene Entwicklungsfähigkeit, die alle Zwischenstadien zwischen „kleiner gebliebenen" Kolonien bis zu solchen, die nur mikroskopisch erkennbar sind, umfassen. Darüber hinaus läßt die mikroskopische Durchmusterung der Platten, am besten nach etwa dreitägigem Wachstum, noch eine Fülle von Übergangsstadien zwischen nicht mehr ent-

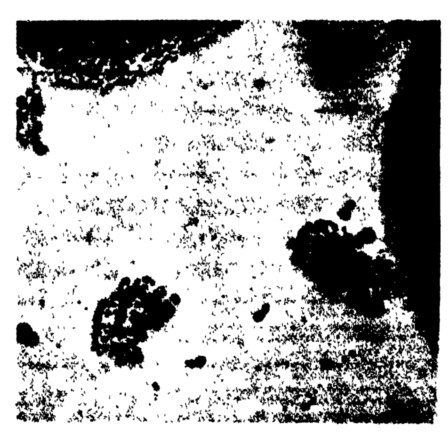


Abb. 3. Obergärige *Frohberg-Hefe*. Kleinkolonien aus Riesenzellen neben Normalkolonien nach Radiumbestrahlung. *Leitz*-Objektiv 3, Okular 6 ×. (Alle Aufnahmen sind mit Miflex-Contax-Apparatur hergestellt und identisch vergrößert). Vergr. 130 ×.

wicklungsfähigen Einzelzellen und Kolonieanfängen, die nur aus wenigen Zellen bestehen, erkennen (Abb. 3). Die Fülle der verschiedenen Kolonie- und Zelltypen läßt sich etwa in folgende Gruppen einteilen:

1. Einzel- oder Doppelzellen (Abb. 4).

Diese können zum Teil zu recht erheblicher Größe anschwellen und führen meist große Fettmengen. Sie sind keiner weiteren Entwicklung fähig und bleiben noch längere Zeit auf den Platten ohne bemerkenswerte Veränderungen liegen. Bei diesen Riesenzellen ist also die Wachstumsfähigkeit erhalten geblieben, ihre Teilungsfähigkeit aber irreversibel geschädigt. Es ist zu vermuten, daß bei den Doppelzellen die Teilung zwar vom Plasma eingeleitet wird, der Kern dabei aber durch seine Schädigung unbeteiligt bleibt.

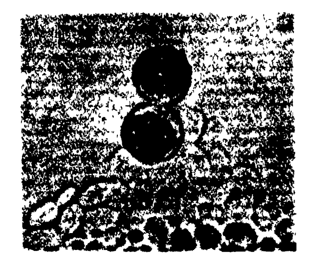


Abb. 4. Obergärige *Frohberg-Hefe*. Riesenzelle am Rande einer Normalkolonie. Vergr. 590 ×.

2. Kleinkolonien aus Riesenzellen mit hochgradig gehemmter Teilungsfähigkeit.

Bei diesem Typus der Schädigung kommt es zwar zu einer Reihe von Teilungsschritten, die alle wieder zu Riesenzellen führen, aber meist erlischt, nachdem 10 bis 30 Zellen gebildet sind, die Teilungsfähigkeit und die Kleinkolonie bleibt unverändert noch längere Zeit erhalten. Bei Abimpfungen dieser sehr kleinen Kolonietypen kam es nie zu weiterer Entwicklung. Man möchte annehmen, daß hierbei Schädigungen des Teilungszentrums, etwa Chromosomenumlagerungen, Stückverluste oder Ausfall ganzer Chromosomen vorliegen, die zwar anfänglich eine Zellteilung noch gestatten, aber durch die bei jeder Teilung erneut auftretenden Teilungsanomalien schließlich kumulativ zum letalen Effekt führen. Eine direkte Demonstration dieser kumulativen Schädigung stellt eine seltener auftretende Abart dieses Typus dar. Hierbei werden Sproßbäumchen aus Riesenzellen gebildet, deren Anfangszellen durchaus normalen Eindruck machen, deren Endzellen aber – mitunter auch mittlere Zellen – unter typischen Plasmoptyseerscheinungen zugrunde gehen (Abb. 5). Die Schädigung macht sich also erst an den Nachkommen der bestrahlten Zellen bemerkbar. Es liegt hier eine auffallende Parallele zu den Erfahrungen der medizinischen Strahlentherapie über Spätfolgen der Bestrahlung vor.

Holthusen, der 1938 das medizinische Material einer eingehenden Besprechung unterzog und auch auf analoge Befunde an pflanzlichen und tierischen Objekten hinwies, spricht hier von einer „heredocellulären Schädigung". Besonders eindrucksvoll sind die von ihm angezogenen Regenerationsversuche von *Meserve* und *Kinney* an bestrahlten *Planarien*. Geköpfte Planarien, die

24 Stunden mit einer vier- bis zwölffachen Hauterythemdosis von Röntgenstrahlen behandelt waren, regenerieren anfänglich das abgetrennte Vorderende ganz normal wie die unbestrahlten Kontrollen. Aber etwa vom Ende der dritten Woche an setzt bei den mit stärkeren Dosen bestrahlten Tieren eine Zelldegeneration im Regenerat ein, die schließlich zu völligem Zerfall führt.

Beobachtungen ähnlicher Art an einzelligen Organismen liegen noch in den Arbeiten von *Petrová* (1936) an *Zygnema* und von *Beutin* (1941) an *Torula*-Arten vor. So weist *Beutin* darauf hin, daß die Zellen der ersten Tochtergeneration häufig stärkere Schädigungserscheinungen aufweisen als die bestrahlten Zellen selbst. *Zygnema* zeigt die Latenz des schädigenden Einflusses

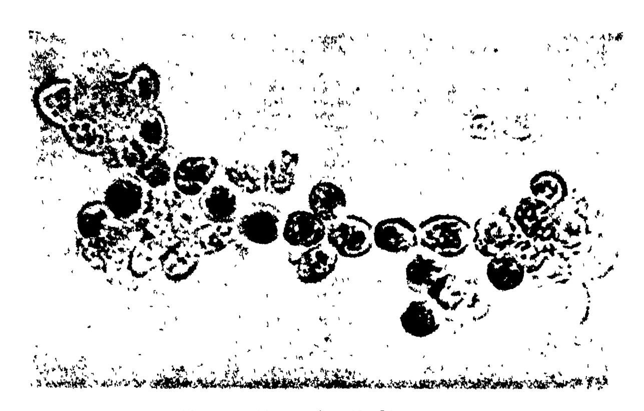


Abb. 5. Obergärige *Frohberg-Hefe*.
Plasmoptysen der Endzellen eines Sproßbäumchens. „Heredocelluläre Schädigung".
Vergr. 590 ×.

der β-Strahlen besonders eindrucksvoll. Auf geringe Strahlendosen reagiert die Alge zunächst mit einem Aussetzen der Teilungen. Dann aber kommt der Teilungsmechanismus wieder normal in Gang. Erst 12 bis 14 Tage nach der Bestrahlung, nachdem bereits eine ganze Reihe von Teilungen abgelaufen sind, erscheinen in vorher ganz gesunden Algenfäden abnormale Zellen, die teilungsunfähig sind.

Es liegt hier also eine anscheinend gesetzmäßige Reaktionsweise von allgemein-zellphysiologischer Natur vor, bei der der Ansatzpunkt der Schädigung wohl überall identisch ist.

3. *Kleinkolonien von Riesenzellen mit Rückschlägen zum Normaltypus.*

Bei diesem Typus entwickeln sich anfänglich meist größere Mengen von Riesenzellen. Die Kolonien bleiben aber in diesem Stadium für gewöhnlich noch unter der für das unbewaffnete Auge bemerkbaren Größe, sind also in ihrer Teilungsintensität gehemmt. Plötzlich treten aber Zellen von normaler Größe auf (Abb. 6) und nun ist die durch die Bestrahlung ausgelöste Teilungshemmung überwunden. Bei genügend

langer Beobachtung können sich diese Rückschlagstypen noch nachträglich zu der Größe von Normalkolonien der betreffenden Hefeart entwickeln.

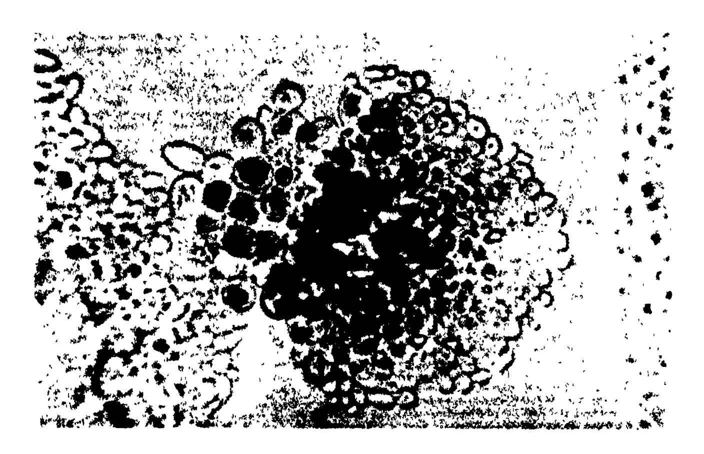


Abb. 6. Diploide *Preßhefe Winge*.
Rückschlag einer Kleinkolonie aus Riesenzellen zum Normaltyp. Rechts und links Ränder von Normalkolonien. Vergr. 590 ×.

4. Kleinkolonien von Riesenzellen ohne Rückschläge.

Sie bestehen aus einer im einzelnen sehr verschieden großen Anzahl von Zellen und können verzögert zu makroskopisch sichtbaren Kolonien heranwachsen (Abb. 7 und 8). Sie bieten dann völlig das gleiche Bild wie die durch chemische Einflüsse entstehenden Gigasrassen.

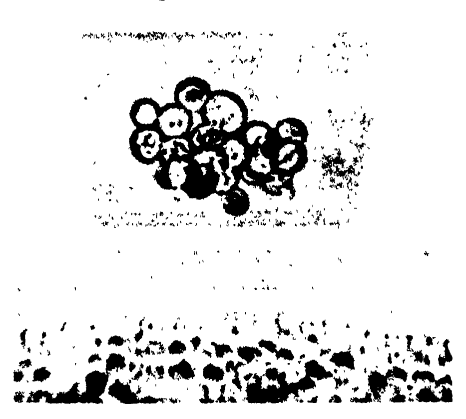


Abb. 7. Haploide *Preßhefe Winge*.
Kleinkolonie aus Riesenzellen, darunter Rand einer Normalkolonie. Vergr. 590 ×.

Von den Erfahrungen ausgehend, die bei der Entstehung der Gigasrassen durch chemische Einflüsse gewonnen waren, mußten diese aus Riesenzellen bestehenden Kleinkolonien des Typus 4 besonderes Interesse erwecken, zumal sie im Gegensatz zu den chemischen Induktionsversuchen hier in recht erheblicher Anzahl auftraten. Zur Prüfung der Frage, ob durch die Radiumbestrahlung tatsächlich Gigasrassen gebildet waren, wurde eine große Anzahl von ihnen — von den verschiedenen Hefearten insgesamt etwa

100 Kolonien — abgeimpft und fortlaufend auf ihre Zellform untersucht. Eine ungewöhnlich große Anzahl der Abimpfungen ging nicht an, ein Zeichen für eine herabgesetzte Vitalität dieser Formen. Durch diesen Ausfall verminderte sich die Zahl der überprüften Kulturen auf etwa 80 Stämme. Die übergroße Mehrzahl der angegangenen Kulturen überraschte schon kurz nach dem Anwachsen durch die Ausbildung von Zellen ganz normaler Größe. Der Rückschlag zur Norm, der ja teilweise schon auf den Aussaatplatten erkennbar gewesen war (Typus 3), ist hier also ebenfalls, nur verspätet, eingetreten. Bei dieser Art der durch Radiumbestrahlung ausgelösten Riesenzellbildung liegt somit keine erbliche Veränderung, kein Mutationsvorgang, vor. Eher könnte man diese Erscheinung dem Begriff der Dauermodifikation einordnen, bei dem man vorwiegend an plasmatisch bedingte Veränderungen, die nach einer kürzeren oder längeren Teilungsfolge reversibel sind, denkt.

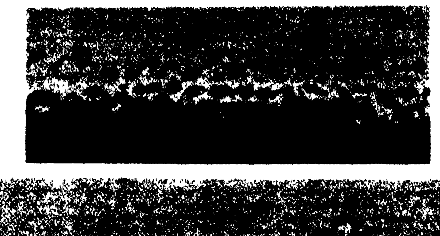




Abb. 8. Klon 1 der *Brauerei-Betriebshefe*.
Oben: Rand einer Normalkolonie.
Unten: Rand einer Kleinkolonie aus Riesenzellen.
Vergr. 590 ×.

Nach Ausscheidung der sofort zum Normaltypus zurückschlagenden Stämme blieben aber noch einige Kulturen übrig, bei denen die Vergrößerung der Zellen längere Zeit erhalten blieb. Insgesamt handelt es sich dabei um vier Stämme. Von diesen stand der Stamm *M 342*, aus dem Klon 1 der *Brauereihefe* gewonnen, zeitlich am längsten unter Beobachtung. Er war Ende Januar 1942 isoliert worden und hatte sich im August 1942, nachdem er etwa monatliche Umimpfungen durchgemacht hatte, kurven- und zahlenmäßig einwandfrei als vergrößert erwiesen. Eine zweite variationsstatistische Auswertung erfolgte im Februar 1943, nachdem er also über 1 Jahr in Kultur stand. Hierbei zeigte er gegenüber dem normalen Vergleichsstamm einen Vergrößerungsfaktor von 1,55. Die drei anderen Stämme waren im Dezember 1941 isoliert worden und wurden im Februar bzw. März 1942, nachdem sich ihre Konstanz erwiesen hatte, statistisch bearbeitet. Sie erreichten dabei ebenfalls Vergrößerungswerte zwischen 1,5 und 1,6. Leider gingen diese Stämme im Anschluß an Feindeinwirkungen im April 1942 verloren, so daß über ihre weitere Konstanz kein Beobachtungsmaterial

vorliegt. Trotz des spärlichen Materials ist somit nicht zu bezweifeln, daß es sich bei diesen durch Radiumbestrahlung gewonnenen Stämmen um völlige Parallelen zu den chemisch ausgelösten Gigasrassen handelt.

Betrachtet man die Gesamtheit dieser Befunde vom Standpunkte der Genetik aus, so läßt sich feststellen, daß die durch Radiumbestrahlung an der *Hefe* ausgelösten Veränderungen sehr verschiedener Natur sind. Bei den Riesenzellen des Typus 1, die nicht weiter vermehrungsfähig sind, wird es sich um weitgehende Zerstörungen des Teilungszentrums, also des Kernes, durch Treffereignisse handeln, wobei das Plasma nur unwesentlich geschädigt wird und seine Wachstumsfähigkeit behält. Beim Typus 2, bei dem eine geringe Anzahl von Teilungen unter Bildung weiterer Riesenzellen durchgeführt werden, ist die Schädigung des Teilungszentrums nicht so weitgehend oder nur partiell. Der Tod der Folgezellen unter Plasmoptyseerscheinungen und das Nichtanwachsen bei der Überimpfung führt zu der Annahme, daß die Schädigungen durch die weiteren Zellteilungen kumuliert werden. Zur Erklärung dieses Typus der „heredocellulären Schädigung" der medizinischen Strahlenbiologie wird man an Veränderungen an Einzelchromosomen oder Verlust ganzer Chromosomen denken müssen. Bei den Typen 3 und 4, die, wie die Kulturversuche ausweisen, fließend ineinander übergehen, liegt bei der überwiegenden Mehrzahl der Fälle ein Analogon zu den reversiblen Dauermodifikationen vor. Nur ein sehr geringer Teil von ihnen behält auf längere Zeit den Riesenwuchs bei. Sie dürften in Parallele zu den chemisch induzierten Gigasrassen mit großer Wahrscheinlichkeit [vgl. *Bauch* (2), S. 50ff.] als Mutationen aufzufassen sein.

Diese Befunde über die experimentelle Auslösung der Riesenzellbildung bei der *Hefe* erlauben einige Rückschlüsse auf die Natur der spontan auftretenden Riesenformen, die besonders in alternden Kulturen zu finden sind. Diese sind ja allen bisherigen Erfahrungen zufolge nicht erblicher Natur. Ihre besonders reichliche Bildung in gealterten Kulturen, bei denen schon autolytische Prozesse eingeleitet sind — *Hennings* (1909, S. 206), weist auf entsprechende Beobachtungen hin —, wird man auf chemisch gesetzte Schädigungen zurückführen können, die eine Sprengung der normalen Korrelation zwischen Zellwachstum und Zellteilung zur Folge haben.

Die Durchführung dieser Untersuchungen wurde durch eine Unterstützung seitens des Reichsforschungsrates ermöglicht. Herrn Prof. *Poppe*, Rostock, danke ich für die in seinem Institut gewährte Gastfreundschaft.

Rostock, 11. Juni 1943.

Literatur.

Bauch, R., 1. Wochenschr. f. Brauerei Nr. 1/2, 1942; 2. Ber. d. Deutsch. bot. Ges. **60**, 42, 1942. — *Beutin, H.*, Strahlentherapie **70**, 322, 1941. — *Erdmann, K.*, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **235**, 470, 1934. — *v. Euler, H., L. Ahlström* u. *B. Högberg*, Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. **277**, 1, 1942. — *Forssberg, A.*, Acta radiol. **14**, 399, 1933. — *Greis, H.*, Zeitschr. f. Bot. **37**, 1, 1941. — *Holthusen, H.*, Strahlentherapie **62**, 228, 1938. — *Holweck, F.*, u. *A. Lacassagne*, C. r. Soc. Biol. Paris **103**, 60, 1930. — *Jordan, P.*, Naturwiss. **26**, 537, 1938. — *Kotzareff, A.*, u. *F. Chodat*, C. r. Soc. Phys. et Hist. nat. Geneve **40**, 36, 1923. — *Lacassagne, A., M. Schoen* u. *P. Béraud*, Ann. d. Fermentations **5**, 9, 1939. — *Lacassagne, A.*, Radiophysiol. et Radiothérap. **3**, 215, 1934. — *Lea, D., R. Haines* u. *C. Coulson*, Proc. Roy. Soc. London (B) **123**, 1, 1937. — *Luria, S.*, C. r. Acad. Sci. Paris **209**, 604, 1939. — *Metalnikoff, S., A. Yakimach* u. *O. Yadoff*, 1. C. r. Acad. Sci. Paris **208**, 605, 1939; 2. ebenda **208**, 1692, 1939. — *Metalnikoff, S.*, u. *A. Yakimach*, Ann. Inst. Pasteur **64**, 47, 1940. — *Motida, N.*, u. *T. Adati*, Strahlentherapie **64**, 468, 1939. — *Nadson, A. G.*, Ann. Roentgenol. et Radiol. Pétersbourg **1**, 47, 1922. — *Derselbe*, Bioch. Zeitschr. **155**, 381, 1925. — *Nadson, G. A.*, u. *E. J. Rochlin*, diese Zeitschr. **4**, 189, 1933; Actualités scient. et industr. Nr. 514, Paris 1937. — *Oster, R. H.*, Journ. gen. Physiol. **18**, 71, 1934. — *Petrová, J.*, Beihefte Bot. Centralbl. A **54**, 370, 1936. — *Pietschmann, K.*, Arch. f. Mikrobiol. **8**, 180, 1937, — *Schreiber, H.*, Strahlentherapie **49**, 541, 1934. — *Sörgel, G.*, Ges. Wiss. Göttingen. Nachr. a. d. Biologie **2**, 155, 1936. — *Whelden, R. M.*, Mycologia **32**, 630, 1940.

(Aus dem Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen.)

Über das Verhalten einiger Mikroorganismen gegen Pyridin.

Von

A. Rippel-Baldes[1], A. Starc und W. Köhler.

(Eingegangen am 19. Juni 1943.)

Der eine von uns (*A. Rippel*) hat die Ansicht ausgesprochen, daß die starke Resistenz der Humusstoffe gegen den Angriff der Mikroorganismen, soweit der Stickstoffgehalt in Frage kommt, darauf beruhe, daß der Stickstoff in diesen Stoffen heterocyklisch gebunden sei. Daß er in dieser Form, allgemein gesehen, schwerer angreifbar ist als sonstiger Stickstoff, kann wohl keinem Zweifel unterliegen, wenn auch der Abbau heterocyklischer Kohlenstoff-Stickstoffverbindungen durch Mikroorganismen bekannt ist; es sei nur auf die letzten Veröffentlichungen von *Bucherer* über den Abbau von Nicotin verwiesen.

Es schien uns von Interesse, den einfachsten Vertreter heterocyklischer Stickstoff-Kohlenstoffverbindungen mit 6er Ring, das Pyridin, genauer zu prüfen, das nach den Angaben in der Literatur schwerer angreifbar zu sein scheint als kompliziertere Verbindungen dieser Art; Literatur über das Verhalten von Mikroorganismen gegenüber Pyridin ist in der auf diese Veröffentlichung folgenden Arbeit von *v. Horváth* (1) angegeben. Zudem sind fast alle Angaben lediglich qualitativer Natur, so daß sich nichts Sicheres erkennen läßt.

Wir prüften zunächst bekannte Mikroorganismen in ihrem Verhalten dem Pyridin gegenüber, in erster Linie *Azotobacter chroococcum*, von welchem Bakterium eine gewisse Vorliebe für aromatische Verbindungen bekannt ist.

Erwähnt sei, daß sich auf Kieselsäuregallerte, die mit Natriumbenzoat und 0,25 bis 0,2 ccm Pyridin durchtränkt und mit Bodenkörnchen geimpft war, zunächst nur *Azotobacter* entwickelte, auf den Platten mit 0,1 bis 0,2 ccm Pyridin selten und viel später einige *Bakterien* (kleine Stäbchen und Kurzstäbchen, wahrscheinlich *Mycobakterien* oder *Proactinomyceten*).

Tabelle I zeigt das Verhalten von *Azotobacter* in Mannitnährlösung mit anorganischen Salzen, ohne gebundenen Stickstoff, bei Gegenwart steigender Mengen von Pyridin. Man erkennt eine deutliche Förderung durch 0,01 und 0,05 ccm Pyridin (auf 50 ccm Nährlösung), bei höheren Gaben eine Schädigung. Der p_H-Wert der Nährlösung ist dabei nicht

[1] Änderung des früheren einfachen Namens des Autors.

Tabelle I. Stickstoffbindung von *Azotobacter chroococcum* bei Gegenwart von Pyridin.

Zugabe von Pyridin je 100 ccm	mg Eiweiß-Stickstoff		Zugabe von Pyridin je 100 ccm	mg Eiweiß-Stickstoff	
	je Kolben	Mittel		je Kolben	Mittel
0	5,48 5,48	5,48	0,10 ccm	3,78 4,46	4,12
0,01 ccm	6,77 6,91	6,84	0,20 „	3,17 3,31	3,24
0,05 „	9,21 10,08	9,65			

Nährlösung: 2% Mannit, 0,08% K_2HPO_4, 0,05% $MgSO_4$, 0,5 mg% Na_2MoO_4, 10 mg% $FeSO_4$, 0,1% $CaCO_3$. Ohne Agar. 50 ccm Nährlösung in 250er Erlenmeyer. Temperatur 29° C. Wachstumszeit 5 Tage. Pyridin nach dem Sterilisieren steril zugegeben.

Tabelle II. Stickstoffbindung von *Azotobacter chroococcum* bei Gegenwart von Pyridin.

Zugabe von Pyridin je 100 ccm	mg Eiweiß-Stickstoff		Zugabe von Pyridin je 100 ccm	mg Eiweiß-Stickstoff	
	je Kolben	Mittel		je Kolben	Mittel
Wachstumszeit 4 Tage.			Wachstumszeit 10 Tage.		
0	10,65 10,80 10,21	10,55	0	20,72 20,86 21,16	20,91
0,05 ccm	11,09 12,84 13,86	12,60	0,05 ccm	15,31 15,73 15,73	15,56
0,10 „	11,53 12,55 12,99	12,35	0,10 „	15,32 15,61 15,90	15,59
Wachstumszeit 7 Tage.			Wachstumszeit 15 Tage.		
0	17,07 17,22 17,36	17,22	0	18,38 18,58 18,82	18,60
0,05 ccm	17,36 17,65 17,65	17,56	0,05 ccm	15,61 15,73 15,90	15,75
0,10 „	16,92 17,22 17,22	17,12	0,10 „	15,73 15,90 16,05	15,89

In den O-Kolben wurden zu diesem Zeitpunkt an Gesamtstickstoff gefunden: 21,45 — 22,32 — 22,47 = 22,08 mg im Mittel.

Der Blindwert betrug: 1,46 mg für die unbewachsene Nährlösung und 1,68 mg für die mit *B. glycinophilus* bewachsene, pyridinfreie Nährlösung.

Nährlösung usw. wie in Versuch der Tabelle I, aber 0,1% Agar und ohne $CaCO_3$. Ferner 0,10% K_2HPO_4.

entscheidend, da 0,1 ccm Pyridin ihn nicht verändert. Tabelle II zeigt einen ähnlichen Versuch mit etwas veränderter Nährlösung, wie angegeben, bei 0,05 und 0,1 ccm Pyridin und verschiedener Wachstumszeit. Nach 4 Tagen ist die Förderung der Stickstoffassimilation bei beiden Pyridingaben unverkennbar, nach 7 Tagen gleich derjenigen der Kulturen ohne Pyridin, nach 10 Tagen haben sich die Verhältnisse umgekehrt: Ohne Pyridin ist die Stickstoffassimilation höher, und der Stickstoffgehalt der Pyridinkulturen ist sogar zurückgegangen. Nach 15 Tagen ist bei den Pyridinkulturen keine weitere Veränderung eingetreten, die Kulturen ohne Pyridin zeigen einen leichten Rückgang, liegen aber immer noch über jenen. Der Rückgang ist offenbar auf Autolyse zurückzuführen. Denn wegen des Vorhandenseins von Pyridin wurde eine Eiweißbestimmung nach *Barnstein* vorgenommen. Die Bestimmung des Gesamtstickstoffs nach 15 Tagen in den Kulturen ohne Pyridin ergab einen höheren Wert, nämlich 22,08 mg gegen 18,60 mg N an Eiweißstickstoff.

Tabelle III zeigt endlich, daß auch in Gegenwart von Pyridindämpfen die gleichen geschilderten Erscheinungen auftreten.

Tabelle III. Wirkung von Pyridindämpfen auf *Azotobacter chroococcum*.

Behandlung	mg Eiweiß-Stickstoff		Behandlung	mg Eiweiß-Stickstoff	
	je Kolben	Mittel		je Kolben	Mittel
Wachstumszeit 2 Tage.			Wachstumszeit 6 Tage.		
Ohne Pyridin	9,63 9,05	9,34	Ohne Pyridin	17,22 18,82	18,02
Mit Pyridindämpfen	11,38 11,38	11,38	Mit Pyridindämpfen	19,40 19,55	19,48
Wachstumszeit 4 Tage.			Wachstumszeit 8 Tage.		
Ohne Pyridin	14,15 14,59	14,37	Ohne Pyridin	21,01 21,89	21,45
Mit Pyridindämpfen	15,03 14,59	14,81	Mit Pyridindämpfen	19,40 19,55	19,48

Der Blindwert betrug:
Ohne Pyridin .... 1,45 mg Eiweiß-Stickstoff je Kolben
Mit Pyridindämpfen ...... 1,60 „ „ „ „

Nährlösung usw. wie in Tabelle II. Die Kölbchen standen in zwei verschiedenen Thermostaten in jeweils getrennten Räumen. In dem einen war etwas Pyridin neben den Kölbchen aufgestellt.

Bei diesen Versuchen läßt sich natürlich nicht erkennen, ob *Azotobacter* lediglich elementaren Stickstoff assimilierte oder auch den des Pyridins. Es war daher notwendig, das Pyridin quantitativ zu bestimmen, wie es im Versuch der Tabelle IV geschehen ist. Die Bestim-

mung wurde kolorimetrisch nach *Barta* vorgenommen, und zwar im Filtrat der Eiweißbestimmung. Es wurde nicht destilliert, da etwa vorhandenes Ammoniak in schwach saurer Lösung nicht stört. Die Brauchbarkeit der Methode wurde vorher an reinen Lösungen ausprobiert. Tabelle IV, in der mit je zehn Parallelkulturen gearbeitet wurde, deren Ergebnisse im einzelnen aufgeführt sind, zeigt eindeutig, daß die Förderung der Stickstoffassimilation durch Pyridin, die bei Zugabe von 0,05 ccm Pyridin je 50 ccm Nährlösung außerordentlich groß ist (nach 5 Tagen untersucht), nicht auf den Verbrauch von Pyridin zurückzuführen ist: Die Kontrollen, ungeimpfte Kölbchen mit Nährlösung + Pyridin, zeigen genau den gleichen Wert, eine geringe, durch Verdunstung bedingte Abnahme. Auch folgende Berechnung zeigt dies: Verschwunden sind rund 21 mg Pyridin = 3,7 mg Stickstoff, mehr assimiliert dagegen 7,2 mg Stickstoff.

Tabelle IV. Pyridinwirkung und Pyridinbestimmungen bei *Azotobacter chroococcum*.

Kolben Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mittel ± r
					mg Eiweiß-Stickstoff je Kolben						
Ohne Pyridin	5,99	5,70	6,22	5,75	6,06	6,19	5,90	5,81	6,22	6,32	6,01 ± 0,21
Mit Pyridindämpfen	6,87	7,37	6,28	8,30	6,68	6,93	7,26	7,00	6,79	7,12	7,06 ± 0,47
Mit 0,05 ccm Pyridin	11,92	12,59	13,22	14,04	13,72	14,12	13,85	12,69	13,90	12,12	13,22 ± 0,79
Darin Pyridin in mg	28,8	30,3	27,8	33,4	23,3	26,3	29,4	30,3	29,4	28,6	28,8 ± 2,8
Ungeimpfte Kontrollen mg Pyridin	32,3	25,0	33,4	30,3	29,4	28,6	32,3	28,6	25.0	29,4	29,4 ± 3,0

Nährlösung usw. wie in Versuch Tabelle I, aber + 0,1% Agar. Wachstumszeit 5 Tage.

$$r = \sqrt{\frac{\Sigma d^2}{n-1}}.$$

Es ergibt sich also: Pyridin wird von *Azotobacter* nicht angegriffen, aber seine Gegenwart erhöht die Schnelligkeit des Wachstums bzw. der Stickstoffbindung, die hier gemessen wurde. Es setzt jedoch gegen Ende des Wachstums eine schnellere Autolyse in Gegenwart von Pyridin

ein, die zur Folge hat, daß schließlich die Pyridinkulturen etwas gegenüber den ohne Pyridin verbliebenen zurückbleiben. Es ist nicht ausgeschlossen, daß Pyridin seine fördernde Tätigkeit durch Wasserstoffübertragung ausübt, was jedoch genauer untersucht werden müßte.

Weitere Versuche wurden mit *Bacillus glycinophilus* angestellt, die in Tabelle V wiedergegeben sind. Bei 0,05 ccm Pyridin, ohne Zugabe von weiterem Stickstoff, trat kein Wachstum ein. Zusatz dieser Menge von Pyridin zu 100 bzw. 25 mg Glykokoll bewirkte, wie die Zahlen zeigen, keine Erhöhung der Stickstoffassimilation, sondern in beiden Fällen eine geringe Schädigung, die besonders groß in der ersten Ent-

Tabelle V. Verhalten von *Bacillus glycinophilus* gegen Pyridin.

Stickstoffgabe	mg Eiweiß-Stickstoff nach Tagen			mg Pyridin nach Tagen		
	4	9	18	4	9	18
100 mg Glykokoll + 0,05 ccm Pyridin	0,58	10,88	17,37	26	23	16
	2,85	8,10	15,84	28	23	17
	6,72	8,25	14,80	25	24	17
	0,36	12,12	16,11	29	24	17
Mittel:	2,63	9,82	15,78	27	23,5	17
	Pyridingehalt der ungeimpften Kontrollen			30	25	17
100 mg Glykokoll	1,83	14,48	16,13			
	10,29	7,13	16,57			
	15,04	14,67	16,42			
	0,58	15,66	16,29			
Mittel:	6,44	12,99	16,35			
25 mg Glykokoll + 0,05 ccm Pyridin		0,95	3,29		22	15
		0,70	3,00		23	15
		3,31	2,29		23	12
		3,36	2,00		24	12
Mittel:		2,06	2,65		23	14
	Pyridingehalt der ungeimpften Kontrollen				22	13
25 mg Glykokoll		3,47	2,85			
		4,01	2,99			
		3,14	2,99			
		4,01	3,21			
Mittel:		3,66	3,01			

Nährlösung: 1,0% Glykose, 0,4% KH_2PO_4, 0,2% K_2HPO_4, 0,01% $MgSO_4$, 0,005% $FeSO_4$. p_H 6,3. Ohne Agar-Zusatz. 50 ccm in 250er Erlenmeyerkölbchen. Temperatur 37° C. Pyridin nach dem Sterilisieren steril zugegeben.

wicklung nach 4 Tagen ist[1]. Die ebenfalls aufgeführten Pyridinbestimmungen zeigen auch hier keinen Unterschied zwischen den geimpften und ungeimpften Kontrollen. Der Versuch wurde noch so abgeändert (Tabelle VI), daß die Kolben fest mit Gummistopfen verschlossen wurden, um die Verdunstung des Pyridins zu verhindern. Man sieht, daß das Bild das gleiche geblieben ist; das Pyridin wurde sowohl in den geimpften wie in den ungeimpften Kulturen quantitativ wiedergefunden.

Tabelle VI. Verhalten von *Bacillus glycinophilus* gegen Pyridin.

Stickstoffgabe	mg Eiweiß-Stickstoff je Kolben	mg Pyridin je Kolben	
		geimpft	ungeimpft
100 mg Glykokoll + 0,05 ccm Pyridin	5,26 5,04 5,26	48 46 49	48 47 49
Mittel:	5,12	48	48
100 mg Glykokoll	6,79 6,72 5,99		
Mittel:	6,50		

Nährlösung usw. wie in Tabelle V. Die Kolben waren durch Gummistopfen fest verschlossen.

Endlich wurden die in Tabelle VII wiedergegebenen Versuche mit den Pilzen *Aspergillus niger*, *Trichoderma viridis* und *Fusarium spec.* gemacht. Die Versuche fielen leider nicht ganz gleichmäßig aus. Jedoch vermochte keiner dieser Pilze auf der angegebenen Nährlösung ohne Zugabe von sonstigem Stickstoff zu wachsen, wenn als Stickstoffgabe 0,05 ccm Pyridin gegeben wurden. Übereinstimmend zeigte sich ferner nach 3 Tagen Wachstum eine geringe Schädigung der Kulturen mit Kaliumnitrat und 0,05 ccm Pyridin. Nach 8 Tagen zeigt *Fusarium* eine starke Schädigung, *Aspergillus* und *Trichoderma* hingegen zeigen eine scheinbare schwache Förderung durch Pyridin. Wie man an den Schwankungen der Einzelwerte sieht, läßt aber der Mittelwert keinen sicheren Schluß zu. Nach 18 Tagen verhalten sich denn auch *Aspergillus* und *Trichoderma* mit und ohne Pyridin gleich bzw. scheint durch Pyridin eine Schädigung erfolgt zu sein, während nunmehr *Fusarium* durch Pyridin etwas gefördert erscheint. Die etwas stärkere Abnahme

[1] Die starken Schwankungen in der ersten Entwicklungszeit zwischen den Parallelkolben sind eine immer wiederkehrende Erscheinung, vor allem, wenn das Wachstum verlangsamt ist, wie es ohne Zusatz von 0,1% Agar der Fall ist.

Tabelle VII. Verhalten verschiedener Pilze gegen Pyridin.

Stickstoffgabe	*Aspergillus niger* nach Tagen			*Trichoderma viridis* nach Tagen			*Fusarium spec.* nach Tagen		
	3	8	18	3	8	18	3	8	18
	mg Eiweiß-Stickstoff je Kolben.								
500 mg Kaliumnitrat	21,07	29,86	13,09	2,10	11,24	18,54	8,03	47,67	36,45
	25,00	32,47	14,96	4,40	9,49	16,37	9,10	37,87	34,43
	28,04	32,41	—	5,02	11,24	—	6,22	41,25	—
Mittel:	24,90	31,45	14,03	3,84	10,66	17,55	7,78	42,26	35,54
500 mg Kaliumnitrat + 0,05 ccm Pyridin	20,46	31,39	14,38	4,49	11,83	13,21	4,64	27,08	39,52
	24,39	35,19	13,58	3,45	18,69	15,33	6,41	29,34	42,92
	19,12	39,08	—	3,13	16,64	—	6,63	29,61	—
Mittel:	21,32	35,22	13,95	3,69	15,72	14,72	5,83	28.68	41,17
	mg Pyridin je Kolben bei Versuchsende.								
500 mg Kaliumnitrat + 0,05 ccm Pyridin; geimpfte Kultur	33	30	22	33	37	26	36	31	25
	32	34	21	33	33	24	39	29	23
	34	33	23	33	33	—	36	30	
Mittel:	33	32	22	33	34	25	37	30	24
Ungeimpfte Kontrolle	36	36	31	36	36	31	36	36	31
	p_H-Wert bei Versuchsende.								
500 mg Kaliumnitrat	5,3	6,7	6,8	5,2	4,6	7,8	4,4	7,1	7,8
500 mg Kaliumnitrat + 0,05 ccm Pyridin	5,7	6,8	6,8	5,1	4,3	7,8	4,4	5,6	8,2

In Kolben mit Pyridin ohne Kaliumnitrat kein Wachstum.

Nährlösung: 5,0% Glykose, 0,5% KH_2PO_4, 0,05% $MgSO_4$, 0,05% NaCl, $FeSO_4$, $ZnSO_4$ und $CuSO_4$ Spuren. p_H 4,5. Pyridin nach dem Sterilisieren steril zugesetzt. 50 ccm Nährlösung in 250er Erlenmeyerkölbchen. Temperatur 30° C.

des Pyridins bei den geimpften im Vergleich zu den ungeimpften Kulturen scheint auf eine gewisse Assimilation des Pyridins hinzudeuten. Indessen beträgt diese Abnahme im höchsten Falle 9 mg Pyridin, was einer Stickstoffmenge von rund 1,6 mg N entspricht, während die scheinbare Zunahme des assimilierten Stickstoffs 4 bis 5,5 mg N beträgt. Es ist daraus zu schließen, daß eine Assimilation des Pyridinstickstoffs kaum stattgefunden hat; die beobachteten scheinbaren Förderungen müssen auf unkontrollierbare Schwankungen zurückgeführt werden. Eine wirkliche Ausnützung des Pyridinstickstoffs hätte einen ganz anderen Ausschlag ergeben müssen.

Demgegenüber lag die anfängliche Förderung der Stickstoffbindung von *Azotobacter* durch Pyridin ganz anders; sie war zwar ebenfalls

nicht erheblich, trat aber so völlig regelmäßig auf, daß an ihrem tatsächlichen Bestehen kein Zweifel sein kann. Nach den mit den übrigen Mikroorganismen gemachten Erfahrungen muß man danach annehmen, daß eine Wasserstoffübertragung des Pyridins, falls dessen Wirkung wirklich darauf zurückzuführen wäre, sich unmittelbar auf die Bindung des elementaren Luftstickstoffs auswirkt. Pyridin als Wasserstoffüberträger würde nach der diesbezüglichen Rolle des Pyridinkernes, z. B. in der Cozymase, auch durchaus möglich erscheinen.

Zusammenfassung.

Die geprüften Bakterien (*Azotobacter chroococcum*, *Bacillus glycinophilus*) und Pilze (*Aspergillus niger*, *Trichoderma viridis* und *Fusarium spec.*) vermögen Pyridin nicht als Stickstoffquelle zu verwerten, wie die quantitative Pyridinbilanz zeigte.

Doch wird die anfängliche Entwicklung von *Azotobacter* durch Gegenwart von Pyridin beschleunigt, es tritt jedoch eine frühere Autolyse ein. Insgesamt wird die Stickstoffbindung nicht beeinflußt. Es wäre zu prüfen, ob Pyridin bei diesem Organismus als Wasserstoffüberträger wirkt.

Literatur.

A. Rippel, *Blancks* Handb. d. Bodenlehre 8, 658, Berlin, Springer, 1931, 1. Ergänzungsband, S. 569. — *Derselbe*, Forschungsdienst, Sonderheft 17, 54, 1941.

Weitere Literatur ist in der nachfolgenden Arbeit von *J. v. Horváth* angegeben.

(Aus dem Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen.)

Beitrag zur Kenntnis des mikrobiellen Abbaus von Pyridin.

Von

J. v. Horváth (Kolozsvár).

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 19. Juni 1943.)

Im Anschluß an die in der vorstehenden Arbeit geschilderten Versuche von *A. Rippel-Baldes* und Mitarbeitern hatte ich mir die Aufgabe gestellt, einen Mikroorganismus aus Boden zu isolieren, der befähigt ist, Pyridin zu zersetzen. Im folgenden berichte ich über eine dabei aufgefundene *Proactinomyces*-Art.

Daß Pyridin, wie auch andere heterocyclische Kohlenstoff-Stickstoffverbindungen, von Mikroorganismen abgebaut werden können, wurde wiederholt beschrieben; jedoch wurde meist keine genauere Beschreibung der wirksamen Mikroorganismen gegeben. *Russel* und seine Schüler prüften hauptsächlich vom Gesichtspunkt der partiellen Sterilisation des Bodens aus eine Reihe von Verbindungen und verwendeten außer Pyridin noch Dimethylpyridin (Lutidin) und Trimethylpyridin (Collidin). Nach der partiellen Sterilisation des Bodens mit diesen Stoffen erfolgte eine starke Vermehrung der Bakterien. Ähnliche Versuche stellte *Robbins* an; auch er fand nach der partiellen Sterilisation des Bodens mit Pyridin starke Bakterienvermehrung und züchtete auf *Brown*schem Albuminagar Bakterien, die die Fähigkeit besaßen, Pyridin abzubauen. Allerdings gibt er keine weitere Beschreibung dieser Organismen und verzichtet überhaupt auf die Gewinnung absoluter Reinkulturen. Weitere Autoren (*Barthel*, *Ehrlich*, *Funches*, *Jewson* und *Tatterfield*, *Meyerhof*) stellten ebenfalls Abbau von Pyridin durch Mikroorganismen fest und geben an, daß Mikroorganismen in Gegenwart von Pyridin am Leben blieben.

Den Dooren de Jong prüfte (Tabelle XX) in einer Nährlösung mit 5% Pyridin (Leitungswasser, dazu noch 1% $MgSO_4$ und 0,1% KCl) zahlreiche bekannte Arten von Bodenbakterien (*Pseudomonas*-, *Mycobacterium*- und andere Stämme) auf ihre Fähigkeit, Pyridin abbauen zu können, ohne jeden Erfolg. In Tabelle IX wird jedoch für *B. aerogenes* und *B. herbicola* deutlicher, für *B. prodigiosum* schwächerer Abbau von Pyridin angegeben, allerdings in anders zusammengesetzter Nährlösung mit nur 0,1% Pyridin. Indessen sind die Versuche auch nur qualitativer Natur.

So läßt sich also nichts Sicheres über pyridinabbauende Mikroorganismen aussagen, und weitere Versuche waren erwünscht. Es gelang nun auf folgende Weise, pyridinabbauende Mikroorganismen zu gewinnen:

Auf Grund der Versuche von *Robbins*, *Bucherer*, *Den Dooren de Jong* stellte ich eine Nährlösung zusammen, die enthielt: 0,1% K_2HPO_4, 0,04% $MgSO_4$,

0,004 % $FeSO_4$, aufgelöst in 100 ccm Göttinger bzw. später in Kolozsvarer Leitungswasser. Als einzige Stickstoff- und Kohlenstoffquelle wurde 0,2% Pyridin gegeben. Das Göttinger Leitungswasser enthält keinen Stickstoff, während das dest. Wasser stets Spuren enthält; das Kolozsvarer Leitungswasser enthält die minimale Menge von 0,008% Stickstoff in Form von Nitrat. Die so bereitete Nährlösung wurde in 250er Erlenmeyerkolben, bei 50 ccm Nährlösung, im Autoklaven bei 1,5 Atm. Druck sterilisiert und mit Boden aus dem Garten des Göttinger Instituts geimpft. Die Kolben wurden im Thermostaten bei 30° C aufgestellt.

Nach 5 bis 6 Tagen konnte ein Abbau des Pyridins festgestellt werden: die Nährlösung ergab starke Reaktion mit Nesslers Reagens auf Ammoniak. Die Kultur wurde nun alle 6 Tage in gleiche Nähr-

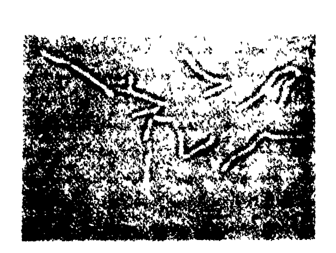


Abb. 1. *Proactinomyces roseus*, junges Mycel. Vergr. 1200.

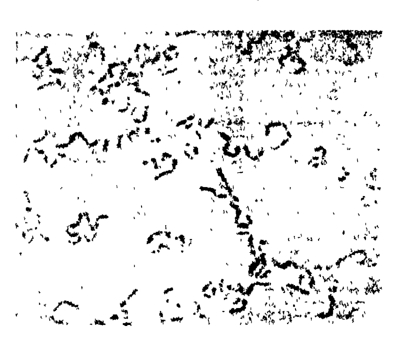


Abb. 2. *Proactinomyces roseus*, älteres, Kokkenstadium. Vergr. 640.

lösung übergeimpft, und diese Behandlung sechsmal wiederholt. Aus der letzten Überimpfung brachte ich 1 ccm, mit sterilem Leitungswasser zehnfach verdünnt, in Pyridin-Agar, der aus der gleichen erwähnten Nährlösung + 2 % Agar bereitet war (vgl. *Bucherer*).

Auf dem Pyridin-Agar entwickelte sich in der Mehrzahl der Fälle ein Mikroorganismus, der nach dem *Koch*schen Plattenverfahren reingezüchtet wurde und nach morphologischer und physiologischer Prüfung unter Berücksichtigung der Arbeiten von *Jensen*, *Krassilnikov* und *v. Plotho* als zu den *Proactinomycetes* gehörig erwies. Von dieser neuen Art gebe ich folgende Charakterisierung:

Proactinomyces roseus nov. spec.

Das mikroskopische Bild des auf Gelatine oder Agar gezüchteten Organismus ist folgendes: In den frisch übergeimpften Kulturen zeigt sich nach 4 bis 5 Tagen ein winziges Mycel (s. Abb. 1). Dieses zerfällt von da ab in kleine Stäbchen und Kokken (s. Abb. 2). Das ganze Bild unterscheidet sich nicht von den durch *v. Plotho* untersuchten *Proactinomyces*-Formen. Die Mycelien bleiben länger erhalten auf *Jensen*schem Dextrose-Phosphat-Nährboden (1 % Glykose, 0,2 % $(NH_4)HPO_4$,

0,1 % K_2HPO_4, 0,05 % $MgSO_4$, 0,05 % NaCl in dest. Wasser. Wenn noch Eisensulfat in Spuren hinzugegeben wurde, bleiben die Mycelien 10 bis 12 Tage bestehen.

Die kleinen Fäden[1] haben 0,7 bis 0,8 μ Breite und 7 bis 14 μ Länge. Eigenbewegung ist nicht vorhanden.

Färbbarkeit: Ausgesprochen grampositiv. Mit den üblichen Anilinfarben leicht färbbar, dabei sind häufig perlschnurartig angeordnete „Granula" zu sehen. Sie stellen offenbar den Beginn der Kokkenbildung dar. Aus je einer „Granula" entsteht je ein Coccus (s. Abb. 2).

Säurefestigkeit: Nach *v. Plotho* mit n Schwefelsäure behandelt wird völlig entfärbt, bei Behandlung mit n Essigsäure und n/100 Schwefelsäure verbleibt nur schwache diffuse Färbung.

Der Organismus ist ausgesprochen aerob.

Auf den gewöhnlichen Nährböden erfolgt gutes Wachstum.

Gelatineplatte: Keine Verflüssigung. Die Kolonien wachsen bei 20° C langsam. Sie sind kreisrund und erhaben, ältere Kolonien zeigen jedoch unregelmäßige Formen. Die Oberfläche ist feucht und glatt, die Farbe der Kolonie schmutzigweiß.

Gelatine-Stich: Keine Verflüssigung. Die Farbe der Kolonie ist schmutzigweiß. Wachstum jedoch nur im obersten Teil des Stichkanals, was bei dem ausgesprochen aeroben Wachstum erklärlich ist.

Gelatine-Strich: Keine Verflüssigung. Farbe schmutzigweiß.

Glykose-Agar-Platte: Bei 30° C reichliches Koloniewachstum. Kolonien kreisrund, erhaben, mit glatter Oberfläche. Bei Dunkelkultur ist die Farbe der Kolonien gelbweiß, bei normalem Licht gezüchtet blaßrosa. Das Substrat wird niemals gefärbt.

Glykose-Agar-Stich: In der Stichröhre kein Wachstum, nur in der Nähe der Stichöffnung, hier aber so üppig, daß die Öffnung sich trichterförmig senkt und die Kolonien bald zusammenfließen. Farbe charakteristisch blaßrosa wie bei der Glykose-Agar-Platte.

Glykose-Agar-Strich: Die Kolonien sind anfangs erhaben und kreisrund, verschmelzen aber bald. Farbe ebenfalls blaßrosa wie bei der Glykose-Agar-Platte.

Glycerin-Agar-Platte: Intensiver Kolonienwachstum. Kolonie ausgesprochen erhaben, kreisrund, mit glatter Oberfläche. Die Farbe ist ein wenig lebhafter rosarot als bei Glykose-Agar.

Glykose-Phosphat-Agar-Platte nach *Jensen*: Form der Kolonien wie bei den vorhergehenden. Farbe cremeartig, weicht also von der auf den vorher beschriebenen Nährböden ab. Wahrscheinlich beeinflußt das dem Nährboden zugesetzte Eisen die Farbe.

---

[1] Wenn *Bucherer* (2) von seinem *Bacterium nicotianum* sagt, daß es manch mal „Fäden" bilde, so wäre, falls es sich um eine Reinkultur handelt, zu prüfen, ob nicht eine *Proactinomyces*- oder *Mycobacterium*-Art vorliegt.

Bouillon: Bei 30° C auf der Nährlösung deutliche Häutchenbildung, am Grund der Nährlösung geringer, schwach fadenziehender Bodensatz.

Milch: Optimales Wachstum. Keine Peptonisierung oder Koagulation.

Lackmus-Milch: Rötliche Färbung.

Glykose, Saccharose, Mannit, Glycerin: Gutes Wachstum, starke diffuse Trübung der Kulturflüssigkeit.

Säure- und Alkalibildung: Neutralem Glykose-Agar wurde Kongorot, Lackmusblau und Chinablau zugesetzt. Die durch die Verfärbung kenntliche Säurebildung war gering, die p_H-Werte betrugen 6 bis 6,2 und blieben während mehrerer Wochen konstant.

Versuche über den Abbau des Pyridins.

Auf Pyridin-Agar der eingangs erwähnten Zusammensetzung, der also Pyridin als einzige Stickstoff- und Kohlenstoffquelle enthielt, entwickelten sich nur schwache Kolonien. Bei gleichzeitigem Zusatz von Glykose war das Wachstum optimal. Bei Zusatz von Glykose kann also der Stickstoff des Pyridins besser ausgenutzt werden, wie folgender Versuch noch genauer zeigt: Werden 20 ccm Pyridin-Nährlösung (ohne besondere Kohlenstoffquelle) mit ein bis zwei Platinösen Bakterien beimpft und bei 30° C aufgestellt, so erhält man nach 4 bis 5 Tagen eine starke Ammoniakreaktion mit Nesslers Reagens, die bei umgeimpften Kontrollen natürlich ausblieb, wie ausdrücklich festgestellt sei. Die Vermehrung des Organismus bleibt aber gering, die Nährlösung wurde lediglich opaleszierend. Noch charakteristischer war das mikroskopische Bild: Bereits 1 Tag nach der Impfung waren Kokkenformen festzustellen.

Ganz anders war das Bild, wenn zu dieser Nährlösung noch 1% Glykose zugegeben wurde (eine solche Nährlösung verwendete auch *Robbins*). Unter den gleichen Kulturbedingungen wie oben entstand nach 4 bis 5 Tagen auf der Oberfläche der Kulturflüssigkeit eine Kahmhaut von ansehnlicher Dicke. Nach 10 Tagen war, nach Aussage der Fehling-Probe, alle Glykose verschwunden, und die Nessler-Probe zeigte, daß auch kein Ammoniak mehr vorhanden war. Da der p_H-Wert 5,6 betrug, so kann das Ammoniak nicht durch Verflüchtigung verloren gegangen sein, sondern es war anzunehmen, daß es von dem Organismus assimiliert war.

Es waren nun die Fragen zu beantworten: 1. In welchem Maße zersetzt der Organismus das Pyridin zu Ammoniak, wenn Pyridin als einzige Stickstoff- und Kohlenstoffquelle vorhanden ist? 2. Verwendet er etwas von dem Pyridin? 3. Was geschieht mit dem Pyridin bzw. Ammoniak bei Vorhandensein von Glykose? Diese Fragen waren nur durch quantitative Versuche zu lösen.

Zu diesen Versuchen wurden ein mit drei Öffnungen versehenes *Wulf*sches Gefäß von 1 Liter Inhalt verwendet; die Öffnungen waren mit eingeschliffenen Glasstöpseln verschlossen. Durch den einen Stöpsel führte eine bis auf den Grund der Kulturflüssigkeit reichende, mit Glashahn versehene Kapillare, damit aus Kontrollversuchen mittels der Vakuumpumpe jederzeit ein paar Tropfen des Versuchsmaterials steril entnommen werden konnten. Der zweite, mit Hahn und kurzer Einführungsröhre versehene Stöpsel diente zur Einführung von Luft zur Zeit der Materialentnahme; ein Wattepfropf in der Einführungsröhre verhinderte die Infektion. Die dritte Öffnung diente zum Eingießen der Kulturflüssigkeit und zur Impfung.

Wieviel Pyridin wird zersetzt, wenn dieses als einzige Kohlenstoff- und Stickstoffquelle vorhanden ist? Ein *Wulf*sches Gefäß erhielt 50 ccm der eingangs erwähnten Pyridin-Nährlösung und wurde nach dem Sterilisieren mit zwei Ösen von auf Glykose-Agar gezüchtetem *P. roseus* beimpft. Ein zweites Kontrollgefäß blieb ungeimpft. Kultur bei 26° C im Thermostaten. Nach 1 Tag bereits zeigte das Versuchsgefäß intensive Ammoniakbildung nach *Nessler*, während im Kontrollgefäß keine Ammoniakbildung festzustellen war. Die quantitative Bestimmung des Ammoniaks nach *Cleghorn-Jendrassik* in einigen vorher bakterienfrei filtrierten Proben ergab eine *quantitative* Umwandlung des Pyridins in Ammoniak. Der Versuch wurde mehrmals mit dem gleichen Ergebnis wiederholt.

Wieviel Pyridin- bzw. Ammoniak-Stickstoff verwendet nun der Organismus, wenn dieses als einzige Stickstoff- und Kohlenstoffquelle vorhanden ist? Es wurden aus Gefäßen des vorstehend beschriebenen Versuchs nach 6 Tagen Proben entnommen. Die Ammoniakbestimmung ergab, daß kein Stickstoff verwendet war. Das Wachstum bei Pyridin als einzige Stickstoff- und Kohlenstoffquelle ist also in der Tat ganz minimal, so daß der Nachweis des assimilierten Stickstoffs sich offenbar innerhalb der Fehlergrenzen hält, wenn nicht das minimale Wachstum überhaupt aus dem Reservematerial der Impfung erfolgt.

Die dritte Frage war die nach der Verwendung des Pyridin-Stickstoffs in Gegenwart von Glykose. Die Methodik war die gleiche; zu der Pyridin-Nährlösung war 1% Glykose zugesetzt. Die Kulturen standen im Thermostaten bei 30° C. Durchschnittlich war am 10. Tage die Glykose restlos verbraucht und der Stickstoff aus der Nährlösung verschwunden. Eine Eiweißbestimmung in der Kultur ergab, daß der Pyridin-Stickstoff restlos in Eiweiß überführt worden war. Auf 100 ccm Nährlösung bezogen wurden 35,75 mg N im Eiweiß gefunden, gegen 35,42 mg, die in der 0,2%igen Pyridin-Nährlösung gegeben wurden. Das Mehr liegt gänzlich innerhalb der Fehlergrenzen, falls es nicht

durch den geringen Stickstoffgehalt der Impfung (zwei Platinösen) hervorgerufen wurde.

Immerhin wurde auch noch versucht, nachzuweisen, ob der Organismus Luftstickstoff bindet. Dabei wurde die von *Rippel* angegebene Nährlösung verwendet. Die Kontrollen ergaben im Mittel 0,14 mg Stickstoff, die zehntägigen Kulturen 0,28 mg. Bindung des elementaren Stickstoffs konnte also innerhalb der Fehlergrenzen nicht nachgewiesen werden.

Während also der Organismus bei Pyridin als einziger Kohlenstoff- und Stickstoffquelle den Kohlenstoff des Pyridins kaum zum Körperaufbau verwendet, das Pyridin jedoch unter Ammoniakbildung zerstört, wird in Gegenwart von Glykose der Pyridin-Stickstoff restlos zusammen mit dem Glykose-Kohlenstoff zum Körperaufbau verwendet.

Es interessierte noch die Frage, ob der Organismus imstande ist, Pyridin allein oder in Gegenwart von Glykose anaerob abzubauen. Zu diesen Versuchen wurde das *Burri*sche Anaerobeverfahren verwendet. Nachdem die Kulturen 7 Tage bei 30° C im Thermostaten gestanden hatten, ergab die Pyridinbestimmung nach *Barta*, daß anaerob Pyridin nicht abgebaut wurde.

Schließlich prüfte ich, wieweit Pyridin in Gasform durch den vorliegenden Organismus verwendet wird. Zu diesen Versuchen benutzte ich Petrischalen mit *Pringsheim*scher Kieselsäuregallerte. Eine Platinöse wurde in sterilem Leitungswasser auf das Hundertfache verdünnt, daraus wurde mit 0,5 ccm eine Oberflächenkultur hergestellt. Auf die innere Seite des Deckels der Petrischale klebte ich ein Stückchen mit Pyridin getränkter Watte und hielt die so vorbereitete Kultur bei 30° C in einer schwach feuchten Kammer verschlossen. Trotz wiederholter Versuche konnten keine, bei 50facher Vergrößerung sichtbare Kolonien aufgefunden werden. Es konnte aber angenommen werden, daß die Vermehrung der Bakterien zu gering war, um erkannt zu werden, oder daß die durch die Impfung vorhandenen Bakterien das Pyridin zu Ammoniak abbauten. Daher wurde auf eine 8 Tage alte Kultur in dünner Schicht *Nesslers* Reagens gegossen und dieses in ein Gläschen abgegossen. Es war jedoch keinerlei Reaktion zu beobachten. Pyridin in Gasform scheint also nicht von dem Organismus angegriffen zu werden.

Zusammenfassung.

Bei der Suche nach einem Mikroorganismus, der imstande ist, Pyridin abzubauen, isolierte ich aus Göttinger Gartenboden *Proactinomyces roseus nov. spec.*

Dieser Organismus baut Pyridin in 0,2 %iger Nährlösung, wenn es als einzige Kohlenstoff- und Stickstoffquelle gegeben wird, restlos zu

Ammoniak ab. Nachweisbare Körpermasse wird dabei nicht gebildet. In Gegenwart von 1 % Glykose wird der Pyridin-Stickstoff quantitativ zu Organismeneiweiß verarbeitet.

Die Verarbeitung von Pyridin allein oder in Gegenwart von Glykose erfolgt nur auf aerobem Wege.

Pyridin in Gasform wurde nicht verarbeitet.

Die „gewöhnlichen" Mikroorganismen fehlende Fähigkeit zum Abbau des Pyridins erweist sich somit als eine Eigenschaft spezifischer Formen von Bodenmikroorganismen.

Literatur.

L. Barta, Biochem. Zeitschr. **277**, 412, 1935. — *C. Barthel*, Centralanst. försöhsv. päjord. **308**, 1926. — *H. Bucherer*, 1. Centralbl. f. Bakt. II, **105**, 166, 1942; 2. ebenda **105**, 445, 1943. — *R. A. Cleghorn* u. *L. Jendrassik*, Biochem. Zeitschr. **274**, 189, 1934. — *L. E. Den Dooren de Jong*, Bijdrage tot de kennis van het mineralisatieproces. Rotterdam 1926. — *F. Ehrlich*, Biochem. Zeitschr. **79**, 152, 1916. — *M. J. Funches*, Ala. Agr. Exp. Stat. **191**, 196, 65, 1917. — *H. L. Jensen*, Proc. Linn. Soc. NSW **56**, 79 u. **345**, 1931; **59**, 18, 1934. — *S. T. Jewson* u. *F. Tatterfield*, Ann. appl. Biol. **9**, 213, 1922. — *N. A. Krassilnikov*, Bull. Academ. Sc. USSR. Cl. Sc. Math. **1**, 51, 1938. — *O. Meyerhof*, Pflügers Arch. **164**, 853, 1916. — *O. v. Plotho*, diese Zeitschr. **13**, 93, 1942. — *A. Rippel-Baldes*, *A. Starc* u. *W. Köhler*, diese Zeitschr. **13**, 365, 1943. — *W. J. Robbins*, Ala. Agr. Exp.Stat. **195**, 49, 1917. *E. J. Russel* u. *H. B. Hutchinson*, J. Agr. Sc. **3**, 111, 1909; *E. J. Russel* u. *J. Golding*, J. Soc. Chem. Ind. **30**, 471, 1911; *E. J. Russel* u. *F. R. Petherbridge*, J. Agr. Sc. **5**, 248, 1913.

Beiträge zur Kultur phytoparasitischer Pilze auf definierten Nährböden.

Von

Friedrich Gerhardt, Berlin.

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 11. August 1943.)

Ein großer Teil der phytoparasitischen Pilze läßt sich nur schwierig oder überhaupt nicht auf künstlichen Nährböden kultivieren. Bei den gebräuchlichen künstlichen Nährböden handelt es sich zumeist um Extrakte aus Pflanzenmaterial oder Fleisch, die mit Agar-Agar gelatiniert werden. Geht man aber zu den physiologisch näher definierten Nährböden, die nur chemisch wohldefinierte Bestandteile enthalten, über, so engt sich die Zahl der kultivierbaren Pilze weiter ein (vgl. *Monilia*, *Botrytis* usw.).

Zum Studium der Physiologie parasitischer Pilze ist es aber unerläßlich, auch die Stoffe kennenzulernen, aus denen die Pilze ihren Organismus aufbauen und ihre Fortpflanzungsorgane entwickeln können. Traubenzucker, Milchzucker usw., die von den meisten tierischen Organismen assimiliert werden, eignen sich nur für wenige meist saprophytischer Pilze zur Ernährung. Daher ist die Auffindung der Kohlenstoffquellen, die zur Ernährung der betreffenden Pilze erforderlich sind, von größter Wichtigkeit. Neuerdings sind zahlreiche Arbeiten erschienen, deren Aufzählung im Rahmen dieser Darstellung aber zu weit führen würde, in denen die Verfasser durch Wuchsstoff- oder Vitaminzugaben bei verschiedenen Pilzen ein besseres Wachstum erzielt haben und daraus nun die Schlußfolgerung ableiten, daß Wuchsstoffe, Hormone oder Vitamine zum Leben gewisser Pilze erforderlich sind. Diese Ergebnisse, deren Bedeutung unbestritten ist, lenken aber von der überaus wichtigen Kernfrage nach der geeigneten Kohlenstoffquelle der betreffenden Pilze ab.

Schopfer und *Blumer* (1, 2) haben mit *Ustilago violacea* und Vitamin B_1 den Versuch unternommen, die Kohlenstoffquelle ausfindig zu machen, die dieser Pilz hauptsächlich verarbeitet. Sie haben dabei zahlreiche Kohlenhydrate und andere organische Stoffe als Kohlenstoffquelle für diesen Pilz geprüft, dabei aber eine in der Pflanzenwelt weitverbreitete C-Verbindung übersehen, das *Pektin,* das nach eigenen Versuchen als die natürliche Kohlenstoffquelle für eine ganze Reihe von Pilzen in Frage kommt.

Es ist in der Phytopathologie eine wohlbekannte Tatsache, daß die meisten phytoparasitischen Pilze intercellular wachsen. Die Mittellamelle, die die einzelnen Zellen miteinander verbindet, besteht bekanntlich aus Pektin, und zwar dem Protopektin. Es ist in Wasser unlöslich und wird durch das Ferment Protopektinase zu wasserlöslichem Pektin abgebaut. Es liegt nahe, in derartigen parasitischen Pilzen ein solches Ferment für den Abbau des wandständigen Pektins und dessen Verwertung zur Ernährung zu vermuten. Für zahlreiche phytopathogene Pilze und Bakterien, wie *Botrytis*, *Monilia*, *Pythium*, *Phytophthora*, *Fusarium*, *Bacillus phytophthorus* u. a. m., ist die Ausscheidung dieses Ferments bereits nachgewiesen worden (3, 4, 5). Das gute Gedeihen aller eben aufgeführten Pilze auf Malzagar wird mindestens zum Teil auf dessen Gehalt an Pektin zurückzuführen sein, das nach eigenen Versuchen, wie noch näher ausgeführt werden soll und durch Photographien belegt werden kann, sich für verschiedene dahingehend untersuchte Pilze als für Wachstum und Entwicklung des Pilzes überlegene C-Quelle erwiesen hat.

Experimentelles.

Untersuchungen über Monilia und Botrytis.

Um die in der Einleitung aufgeworfene Frage der geeigneten C-Quelle zu klären, wurden vergleichsweise folgende Nährböden mit *Monilia fructigena* und *Botrytis cinerea* geimpft:

1.	2.	3.
2 % Agar-Agar,	2 % Agar-Agar,	2 % Agar-Agar,
2 % Pektin,	2 % Glucose,	0,25 % Asparagin,
0,25 % Asparagin,	0,25 % Asparagin,	0,15 % KH_2PO_4,
0,15 % KH_2PO_4,	0,15 % KH_2PO_4,	0,05 % $MgSO_4$.
0,05 % $MgSO_4$.	0,05 % $MgSO_4$.	

Das Pektin Merck für wissenschaftliche Zwecke, das zu diesen Versuchen verwandt wurde, war durch dreimaliges Ausschütteln mit 96%igem Alkohol von gegebenenfalls noch anwesenden Mengen Vitamin B_1 befreit worden.

Für *Botrytis* wie auch für *Monilia* ergab sich folgendes:

Die Kulturen auf Nährboden 1 (Pektin als C-Quelle) entwickelten sich äußerst schnell und lieferten bald die charakteristischen Wuchsformen, wie sie an der Wirtspflanze auftreten; sowohl für *Botrytis cinerea* wie auch für *Monilia fructigena*. Auf Nährboden 2 war bei beiden Pilzen nur ein schwaches Wachstum festzustellen, das dem von Nährboden 3 gleichzusetzen war. Die beobachtete, wenn auch geringe Entwicklung auf den Nährböden 2 und 3 wird wohl auf die Ausnutzbarkeit der Kohlenstoffquelle Asparagin zurückzuführen sein, da auf reinem Agar-Agar kein Wachstum von *Botrytis* und *Monilia* stattfindet.

Aus den beigefügten Photos (Abb. 1a bis 1c und Abb. 2a und 2b)[1] ist deutlich der Unterschied in der Ausnutzung der Kohlenstoffquellen zu ersehen.



Abb. 1a. *Botrytis cinerea* auf Nährboden 2.



Abb. 1b. *Botrytis cinerea* auf Nährboden 1.



Abb. 1c. *Botrytis cinerea* auf Nährboden 1.
Ältere Kultur mit 3 Impfstellen.



Abb. 2a. *Monilia fructigena* auf Nährboden 2. Abb. 2b. *Monilia fructigena* auf Nährboden 1.

[1] Alle Abbildungen zeigen Petrischalen-Kulturen der Pilze.

Auf Nährboden 1 tritt bei *Monilia fructigena* im weiteren Wachstumsverlauf Schwärzung des älteren Pilzgewebes auf sowie Bildung von Sklerotien. Die Bildung von Apothecien aus den Sklerotien konnte bisher nicht beobachtet werden, da die Arbeiten, durch Zeitumstände bedingt, eine Unterbrechung erfuhren. Aus dem beigefügten Photo Abb. 1c ist bei einer älteren Kultur von *Botrytis* eine prächtige Sklerotienbildung am Rande der drei Wachstumsstellen zu erkennen, die von drei Überimpfungen auf die gleiche Platte herrühren.

Untersuchungen über Brandpilze.

Diese Erfolge reizten dazu, diesen neuen Nährboden auch für einige andere Pilze auszuprobieren und es wurde der Versuch unternommen, das Wachstum einiger schwierig zu kultivierender *Brandpilze*,

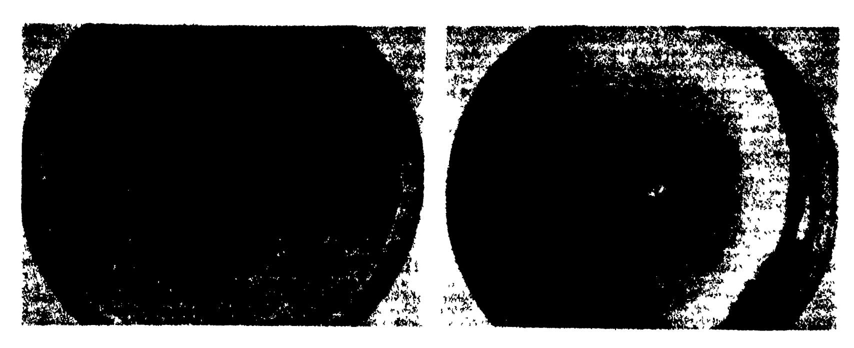


Abb. 3a. *Ustilago avenae* auf Nährboden 2. Abb. 3b. *Ustilago avenae* auf Nährboden 1.

die ja auch intercellulär wachsen, auf ihnen zu verfolgen. Rein äußerlich ergab sich auf den vorher angegebenen Nährböden bei *Ustilago avenae* das gleiche Bild wie bei *Botrytis* und *Monilia*. *Ustilago avenae* bildete zusätzlich auf Nährboden 1 noch ein mächtiges Luftmycel aus (s. Abb. 3a und b). Nach 6 bis 7 Tagen war die Kultur rotbraun gefärbt und roch ziemlich stark nach Ammoniak. Der p_H-Wert des Nährbodens hatte sich innerhalb dieser Zeit von p_H 3,8 bis 4 auf p_H 7 bis 7,5 verschoben, was auf eine intensive Spaltung des Asparagins durch Fermente hinweist. Zu derselben Zeit war auch die beginnende Bildung der typischen Brandsporen zu beobachten, bis nach 3 bis 4 Wochen die Platte etwas eintrocknete und die fertigen Brandsporen im Substrat eingebettet zu sehen waren, die auf neue Nährböden übergeimpft wieder ganz typisch auskeimten und an den entstehenden Basidiosporen zahlreiche hefeartige Konidien bildeten. Die auffällige Tatsache, daß *Ustilago avenae* ebenfalls ein schwaches Wachstum auf dem Nährboden zeigte, der nur Asparagin enthielt, erforderte zu prüfen, ob dieses

Wachstum auf die Ausnutzung des im Asparagin enthaltenen Apfelsäurerestes zurückzuführen war. Deshalb wurde diesem Boden zusätzlich einmal 0,5 %ige Apfelsäure zugefügt und da ergab sich, daß *Ustilago avenae* gleich ein gutes Wachstum unter Bildung eines schwach rosa gefärbten Luftmycels entwickelte. Somit bestätigte sich die Vermutung, daß der Apfelsäurerest des Asparagins als C-Quelle ausgewertet wurde. Nach diesem Experiment scheint es sogar, als ob die Verarbeitung der Kohlenhydrate von Pilzen nicht nur eine Frage des C/N-Verhältnisses ist, sondern auch des Redoxpotentials, das bei Apfelsäure und Pektinen ja ein ganz anderes als bei Zuckern usw. ist.

Eine Überprüfung der Ernährungsverhältnisse des viel virulenteren *Ustilago zeae*, der nach *Ranker* (6) auf einem synthetischen Nährboden, der Glucose enthielt, gedeiht, ergab ebenfalls ein üppiges Wachstum auf dem pektinhaltigen Nährboden 1. Wurde in der *Ranker*schen Nährlösung (0,3 g K_2SO_4, 1 g NH_4NO_3, 1 g $CaCl_2$, 1 g $Mg_3(PO_4)_2$ und 10 g Glucose auf 1 Liter dest. Wasser) die Glucose durch Pektin ersetzt, so gedieh *Ustilago zeae* bald noch üppiger. Am stärksten aber war das Wachstum auf Nährböden mit Pektin und einer organischen N-Quelle.

Um das Pektin als Nahrungsquelle verwerten zu können, müssen die Brandpilze in der Lage sein, das Pektin der Mittellamelle mit Hilfe von Fermenten abzubauen. Die Auflösung der Mittellamelle durch *Ustilago avenae, zeae* und *Tilletia tritici* konnte auf folgende Weise anschaulich gemacht werden.

Die drei genannten Pilze wurden auf einen Agar-Nährboden übergeimpft, der Pektin, Asparagin und Rübenschnitzel enthielt, die nur 10 Minuten sterilisiert waren, in denen also das Protopektin noch nicht durch Kochen in Hydratopektin umgewandelt war. Nach ein paar Tagen, als das Pilzwachstum im vollen Gange war, wurden die Rübenstücke vergleichsweise in einem ungeimpften und in einem geimpften Boden vor dem wachsenden Mycel untersucht, in welchem die Rübenstücke nachweislich kein Pilzwachstum aufwiesen. Mit einem Spatel wurden diese Stücke auf ihre Festigkeit untersucht. Es waren aber lediglich die Stücke vor dem wachsenden Mycel weich geworden. Eine Untersuchung der mikroskopischen Schnitte der Rübenschnitzel aus dem ungeimpften Boden und vor dem wachsenden Mycel mit Rutheniumrot zeigte die gleichen Unterschiede, wie sie bei der Einwirkung von Protopektinase (aus der Weinbergschnecke gewonnen) auf Rübenschnitzel auftreten. Die Stücke vom ungeimpften Boden ließen durch ihre tiefrote Färbung die Mittellamelle deutlich erkennen, während die Stücke vor dem wachsenden Mycel keine ausgeprägte Mittellamelle mehr aufwiesen. Somit erscheint die Absonderung einer Protopektinase durch diese Pilze als recht wahrscheinlich.

Schopfer und *Blumer* (2) hatten bei ihren umfangreichen Versuchen mit *Ustilago violacea* beobachtet, daß ein gutes Wachstum auf definierten

Nährböden erst bei Zugabe von Aneurin erfolgte. Pektin hatten sie ja leider nicht bei ihren Versuchen als Kohlenstoffquelle verwendet. Nach den bisherigen Ergebnissen war zu erwarten, daß auch *Ustilago violacea* auf Pektin besser wachsen würde. Das Pektin wurde wiederum aneurinfrei durch dreimaliges Ausschütteln in 96 %igem Alkohol gemacht.

So wurde folgender Versuch unternommen:

Je drei 100-ccm-Erlenmeyerkölbchen mit je 25 ccm Nährlösung in untenstehender Zusammensetzung wurden nach der Sterilisation mit Konidien von *Ustilago violacea* beimpft, die einer Kultur von Prof. *Schopfer* entstammten, dem hiermit nochmals für die freundliche Überlassung der Kulturen verbindlichst gedankt sei.

Nährboden A.

I:	1%	Glucose,	0,15%	Asparagin,	0,15%	KH_2PO_4,	0,05%	$MgSO_4$;
II:	1%	Pektin,	0,15%	,,	0,15%	,,	0,05%	,,

Nährboden B.

I:	1%	Glucose,	0%	Asparagin,	0,15%	KH_2PO_4,	0,05%	$MgSO_4$;
II:	1%	Pektin,	0%	,,	0,15%	,,	0,05%	,,

Nährboden C

I:	0%	Glucose,	0,15%	Asparagin,	0,15%	KH_2PO_4,	0,05%	$MgSO_4$.
II:	0%	Pektin,	0,15%	,,	0,15%	,,	0,05%	,,

Zur N-Quelle ist zu bemerken, daß Glutamin wahrscheinlich zweckmäßiger gewesen wäre, da die *Caryophyllaceen* ja Glutaminpflanzen sind.

Nach ungefähr 8 Wochen konnte im letzten noch isoliert und ungeöffnet gebliebenen Gefäß von A II die Bildung reifer typischer Brandsporen beobachtet werden, die sich am Boden des Erlenmeyerkölbchens festgesetzt hatten. In den anderen Nährlösungen konnte eine solche Beobachtung nicht gemacht werden. 1 Stunde nach dem Aufbringen der neu gebildeten Brandsporen (in den Kulturen von Prof. *Schopfer* waren nur Konidien) von *Ustilago violacea* auf einen Objektträger konnte unter dem Mikroskop das Auskeimen der Brandsporen und im weiteren Verlauf auch die beginnende Bildung von Basidiosporen an den Keimschläuchen beobachtet werden.

Damit ist der Beweis der bevorzugten Eignung des Pektins als C-Quelle für eine Anzahl phytoparasitischer Pilze erbracht. Aber noch fehlt die Erklärung für das physiologische Verhalten der Brandpilze, die mit Ausnahme des Maisbrandes, der auch junge Blätter usw. befallen kann, nur in keimendes Getreide einzudringen und hinter der wachsenden Spitze dem Wachstum des Halmes folgend bis in die Blüte

vorzudringen vermögen, während sie ältere Gewebszellen nicht infizieren können.

Im keimenden Getreidekorn befinden sich zahlreiche Aminosäuren neben wenig Polypeptiden und Proteinen. Es reizte daher zu prüfen, ob nicht ein Zusammenhang zwischen der Aggressivität und der Fermentgarnitur von *Ustilago avenae* mit dem physiologischen Zustand des befallenen Objekts andererseits besteht. So wurden *Ustilago avenae* und *Ustilago zeae* auf Nährböden übergeimpft, die als einzige C-Quelle 2 % Pektin und als alleinige N-Quelle in einem Falle 1 % Pepton, im anderen Falle 1 % Gelatine enthielten. Dabei zeigte *Ustilago avenae* durch fehlendes Wachstum an, daß dieser Pilz nicht imstande war, die gebotenen N-Quellen zu verwerten, wie aus den wenigen sich entwickelnden Hyphen ersichtlich war, die man nur mittels einer Lupe über dem Pektin-Agar-Eiweißnährboden bemerken konnte. *Ustilago zeae* dagegen wuchs gut, und bei dem Gelatine-Pektin-Agarnährboden konnte man vor dem wachsenden Mycel eine schmale Verflüssigungszone des Nährbodens beobachten.

Es scheint nach diesen Untersuchungen bei diesen beiden Brandpilzen tatsächlich ein Zusammenhang zwischen Aggressivität und Fermentgarnitur einerseits und physiologischem Zustand der Pflanze andererseits zu bestehen.

Weitere Untersuchungen über Botrytis, Monilia und Penicillium spec.

Dem Vermögen von *Monilia fructigena*, verletzte Äpfel schnell zu verderben, steht ebenfalls eine reichliche Absonderung von Proteinasen gegenüber, wie auf einem Nährboden, enthaltend 2 % Pektin und $2^1/_2$ % Gelatine aus der schnellen Verflüssigung der Gelatine vor den wachsenden Zonen zu ersehen war. *Botrytis cinerea* („Schwächeparasit") besaß diese Eigenschaft nur in vermindertem Maße. *Penicillium*-Arten (Saprophyten), die ja bekanntlich nur überreife Früchte befallen, zeigten gegenüber *Monilia* und *Botrytis* nur ein sehr geringes Wachstum auf den Pepton-Gelatine-Pektin-Agarnährböden, dagegen ein annähernd gleich starkes auf Pektin-Asparaginnährböden.

Besprechung der Ergebnisse.

In der vorliegenden Arbeit konnte die in der Einleitung ausgesprochene Vermutung, daß Pektin eine für intercellulär wachsende parasitische Pilze natürliche Nährstoffquelle sei, bestätigt werden. Es ist selbstverständlich, daß die betreffenden Pilze, um das Pektin als Nahrungsquelle benutzen zu können, auch imstande sein müssen, es

abzubauen und in eine für den Organismus verwertbare Form überzuführen. Die Überlegenheit des Pektins als C-Quelle gegenüber den Zuckern ist so auffallend, daß sie zur Annahme einer Beziehung zwischen Eignung der C-Quelle und der Lebensweise der Pilze berechtigt. Sie ist gleichzeitig ein wohl zu beachtender Hinweis für die Herstellung geeigneter künstlicher Nährböden für diese Pilze.

Natürlich ist mit der Lösung der Frage der geeigneten C-Quelle das Gesamtproblem der Nährbodenbeschaffenheit für diese Pilze noch nicht gelöst. Schon die Frage der geeigneten und natürlichen N-Quellen erfordert neue Untersuchungen. Wie die beschriebenen Versuche dartun, scheint zwar eine Beziehung zwischen Pilzaggressivität und Proteinasenaktivität zu bestehen, doch muß zugegeben werden, daß die ungleiche Auswertung der Gelatine zunächst nur auf eine verschiedene Aktivität der spezifisch auf Gelatine eingestellten Proteinase schließen läßt. Entsprechende Versuche mit anderen definierten Eiweißen müssen daher die Breite der Schlußfolgerungen erst erweisen.

Auch die verschiedene proteolytische Aktivität genügt noch nicht zur vollen Erklärung des Parasitismus, sondern es muß auch noch die Spezifität des Verhältnisses von Parasit und Wirt geklärt werden. Da würde 1. die Frage der Unverträglichkeit verschiedener Eiweiße (Fermentträger) eine Rolle spielen und 2. der Gehalt der Pflanze an Stoffen, die giftig auf den Pilz wirken. Ferner wäre für das Verhältnis Parasit—Wirtspflanze noch die Absonderung von toxisch wirkenden Ausscheidungen durch den Parasiten von Bedeutung und von seiten der Pflanze die Ausbildung von Cellulosemembranen. Das Problem der chemisch-physiologischen Erfassung des Parasitismus ist daher noch lange nicht mit der Erfassung der natürlichen Nährstoffquellen gelöst; es ist lediglich ein Baustein mehr zur Erfassung der stofflichen Grundlagen des Parasitismus. Daß außerdem neben den Fragen des „niedrigen Stoffwechsels" diejenigen der Wuchsstoff- und Hormonbedürftigkeit in Verbindung mit den dargestellten Ergebnissen weiterhin experimentell geprüft werden müssen, bedarf wohl keiner weiteren Begründung.

Zusammenfassung.

1. Das Pektin wurde als geeignete C-Quelle für gewisse Pilze festgestellt, die sich bisher auf definierten Nährböden gar nicht oder nur schwierig kultivieren ließen.

2. Bei *Ustilago avenae* und *zeae*, sowie bei *Tilletia tritici* konnte die Absonderung einer Protopektinase wahrscheinlich gemacht werden.

3. Die Verarbeitung der Kohlenhydrate durch Pilze scheint nicht nur eine Frage des C/N-Verhältnisses, sondern auch des Redoxpotentials zu sein.

4. Es konnte ein Zusammenhang zwischen Aggressivität der Pilze und ihrer Proteinaseaktivität einerseits und dem physiologischen Zustand der Pflanze andererseits beobachtet werden.

Literatur.

1) *S. Blumer*, diese Zeitschr. **8**, 458, 1937. — 2) *W. H. Schopfer* u. *S. Blumer*, ebenda **9**, 305, 1938. — 3) *K. P. N. Menon*, Annals of Botany **48**, 187, 1934. — 4) *L. B. Chona*, ebenda **46**, 1033, 1932. — 5) *F. R. Davison* u. *J. J. Willaman*, The Botanical Gazette **38**, 329, 1927. — 6) *R. Ranker*, J. of Agric. Res. **41**, 435, 1930.

(Aus dem Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen.)

Über Eiweißbildung durch Bakterien.

VI. Mitteilung:

Die Wirkung einer Mischung von Aminosäuren auf Bacillus glycinophilus.

Von

August Rippel-Baldes[1] und Werner Köhler.

(Eingegangen am 6. September 1943.)

In der vorhergehenden Mitteilung (*A. Rippel, K. Nabel* und *W. Köhler*) hatten wir darauf hingewiesen, daß eine Mischung von Glykokoll und Alanin bei *Bacillus glycinophilus* besser wirkt als die gleiche Konzentration einer einzelnen Aminosäure; ein Gleiches wurde für die Ammoniaksalze organischer Säuren festgestellt. Die Versuche waren indessen insofern nicht eindeutig, als nur volle Konzentration der Einzelkomponenten verglichen wurde mit der Mischung, nicht aber die Wirkung der Einzelkomponenten in der der Mischung entsprechenden geringeren Konzentration ebenfalls untersucht wurde. Der nachstehend beschriebene Versuch mit Glykokoll[2], Alanin und Leucin sollte diesen Mangel beseitigen. Die Zahlen finden sich in Tabelle I.

Tabelle I.
Bacillus glycinophilus, Wirkung einer Aminosäuremischung.

Stickstoff-Gabe	mg Eiweiß-Stickstoff je Kolben Kulturdauer in Tagen	
	1	3
Glykokoll 0,2 %	1,66	16,09
Alanin 0,24 %	0,86	14,57
Leucin 0,35 %	0	0,65
Mischung dieser 3 = je $^1/_3$	4,42	15,95
Glykokoll $^1/_3$ obiger Menge	2,17	4,85
Alanin $^1/_3$ obiger Menge	1,30	5,65
Leucin $^1/_3$ obiger Menge	0,65	1,74
Summe der $^1/_3$-Gaben	4,12	12,24

Nährlösung: Glykose 1,0%, $MgSO_4$ 0,01%, $FeSO_4$ 0,005%, KH_2PO_4/K_2HPO_4 = 0,4/0,2%, Agar 0,1%, dest. Wasser; 50 ccm in 250er Erlenmeyerkölbchen aus Jenaer 20er Glas. Thermostat bei 37° C. p_H 6,2. Mittel aus je zwei Parallelen.

[1] Änderung des früheren einfachen Namens des Autors. — [2] Da es sich bei dem Glykokoll um synthetisches der „Kohlentechnik"-Dortmund handelte, scheidet ein möglicher Gehalt an Wuchsstoffen als Erklärung für die besonders gute Wirkung des Glykokolls aus.

In der oberen Hälfte der Tabelle ist die Stickstoffgabe von 0,2 % Glykokoll zugrunde gelegt und verglichen mit der gleichen Stickstoffgabe in Form von Alanin und Leucin (0,24 bzw. 0,35 %), dazu die Mischung dieser drei Aminosäuren, jede in ein Drittel dieser Konzentration. Bei den Zahlen ist die Stickstoffmenge für Leucin 0,35 % nach 1 Tag als Blindwert abgezogen; dieser Wert liegt um ein geringes unter dem in der reinen Blindbestimmung ermittelten Wert.

Nach 1 Tag Kulturdauer hat also die Mischung erheblich besser gewirkt als die beste der drei Einzelkomponenten in der der Mischung entsprechenden Konzentration. Mit 4,42 mg Eiweiß-N liegt dieser Wert sogar noch über dem der Summe dieser drei Einzelkomponenten mit 2,52 mg N. Nach 3 Tagen Kulturdauer sind die Zahlen ausgeglichen: der Wert der Mischung entspricht dem bei Glykokoll, der besten N-Quelle, erhaltenen.

Während nun nach 1 Tag Kulturdauer nicht entschieden werden kann, ob auch das Leucin in der Mischung als Stickstoffquelle stärker herangezogen wurde als im Einzelfalle, liegt der Fall nach 3 Tagen Kulturdauer klar: Da je Kolben 18,7 mg N gegeben waren, so können auf Glykokoll + Alanin höchstens 12,5 mg N entfallen gegen 15,95 mg N, die bei der Mischung gefunden wurden. Der Unterschied von 3,45 mg kann also nur durch Assimilation des Leucin-Stickstoffs zu erklären sein, das somit in Mischung erheblich besser verwertet wurde als bei alleiniger Darbietung (0,65 mg).

Wir müssen jedoch weiter die untere Hälfte der Tabelle betrachten, in der die drei Aminosäuren bei jeweils $^1/_3$ Konzentration der oberen Tabellenhälfte verglichen wurden. Es sei ausdrücklich bemerkt, daß es sich um einen gleichzeitig angesetzten Versuch handelt. Bei $^1/_3$ Konzentration wirkten die einzelnen Aminosäuren besser als bei voller Konzentration, wenn wir die Ergebnisse nach 1 Tag Kulturdauer betrachten. Das entspricht durchaus dem, was von dem Ertragsgesetz bekannt ist (*A. Rippel*). Nach 3 Tagen Kulturdauer ist natürlich die N-Menge der $^1/_3$ Konzentration absolut geringer als die der vollen Konzentration.

Die Summe der drei Aminosäuren ergab nach 3 Tagen Kulturdauer 12,24 mg Eiweiß-N gegen 15,95 mg bei der Mischung der oberen Hälfte der Tabelle, die somit merklich besser wirkte. Diese bessere Wirkung ist auch bereits nach 1 Tag zu erkennen, wenn auch die Werte (4,42 mg Eiweiß-N der Mischung gegen 4,12 mg der Summe der Einzelaminosäuren in jeweils $^1/_3$ Konzentration) nicht so weit auseinanderliegen, daß man mit voller Sicherheit von einem Unterschied sprechen könnte. Allerdings ist in der unteren Tabellenhälfte Glykokoll vom 1. zum 3. Kulturtag merkwürdigerweise etwas zurückgeblieben (obwohl die Parallelen übereinstimmen). Zum Ausgleich wollen wir zu den Glykokollzahlen nach 3 Tagen Kulturdauer in der unteren Tabellenhälfte noch

1 mg N hinzurechnen. Als Summe ergibt sich dann 13,24 mg Eiweiß-N bei den $^1/_3$ Konzentrationen gegen 15,95 mg bei der Mischung dieser Konzentrationen, also ein Unterschied von 2,71 mg Eiweiß-N, der nur durch die bessere Verarbeitung des Leucins zu erklären ist. Selbst wenn wir annehmen, daß in Wirklichkeit Glykokoll und Alanin zu 100 % verarbeitet wären, so würde die Summe dieser beiden 12,5 mg Eiweiß-N für die $^1/_3$-Gaben ergeben. Rechnet man die 1,74 mg Eiweiß-N des Leucin der $^1/_3$-Gabe hinzu, so verbleibt mit 14,24 mg, verglichen mit den 15,95 mg der Mischung, immer noch ein Plus von 1,71 mg Eiweiß-N für die Mischung, das nur durch bessere Verarbeitung des Leucin in dieser erklärt werden kann. Für dieses ergibt sich demnach in der Mischung ein Wert von mindestens 1,74 + 1,71 = 3,45 mg Eiweiß-N gegen 0,65 mg bei alleiniger Darbietung in voller Konzentration.

Was besagen nun diese Zahlen? In der vorhergehenden Veröffentlichung hatten wir die Herabsetzung der Konzentration der einzelnen Aminosäuren in der Mischung in Betracht gezogen, da ja jede höhere Konzentration zunächst eine Schädigung bedingt, auch wenn im Gesamtablauf der Verarbeitung die höhere Konzentration schließlich noch zu einer Ertragssteigerung führt. wie es allgemein nach dem Ertragsgesetz der Fall ist (*A. Rippel*). Wir wiesen aber schon darauf hin, daß dies allerdings voraussetzt, daß jede einzelne Komponente einen *spezifischen* Schädigungsfaktor besitzt, da in der Mischung die *Gesamt*-Konzentration ja die gleiche ist wie bei der Einzelkomponente. Bei gleichem Stickstoffgehalt haben wir ja in Hinblick auf die Aminosäuren äquimolekulare Lösungen.

Frühere Versuche zeigten weiterhin (*A. Rippel* und *W. Lohrmann*), daß *jede* Giftwirkung, auch solche, die nicht von einem normalerweise als Nahrungsfaktor in Betracht kommenden Stoff ausgeübt werden, eine Nährstoffwirkung entfalten können, falls dieser Stoff antagonistisch auf die Giftwirkung eines anderen Stoffes wirkt. So kann man die Wirkung von Calcium durch Tannin ersetzen, wenn Magnesiumsulfat als zweiter Schädigungsfaktor vorhanden ist, ferner durch Borsäure und Sublimat.

Es bleibt demnach nur die Annahme übrig, daß die Schädigung durch die einzelnen Aminosäuren sich gegenseitig antagonistisch beeinflussen. Denn, worauf noch einmal ausdrücklich hingewiesen sei, in der Mischung wirkt z. B. das besonders „giftige“ Leucin erheblich besser als in der Einzelkonzentration, die der Konzentration in der Mischung entspricht, wie oben angeführt wurde.

Wie die Schädigung durch die einzelnen Aminosäuren zustande kommt, bleibt dabei vorerst unbestimmt. Bei der besonderen Vorliebe

des Bakteriums für Essigsäure liegt die Annahme nahe, daß es sich in der Hauptsache um eine Wirkung der Kohlenstoffketten der Aminosäuren handelt. Diese Auffassung wird noch weiter durch die Tatsache unterstützt, daß die geprüften Aminosäuren, wie in der vorangehenden Mitteilung gezeigt wurde, vor der Verarbeitung desaminiert werden. Da der Organismus zudem Ammoniak als N-Quelle ebensogut auszunützen vermag wie Aminosäuren, so kann es sich also kaum um eine Wirkung der Aminosäuren als solcher handeln, wie sie von anderen Autoren bereits beobachtet wurde. Darüber können indessen erst weitere Versuche endgültigen Aufschluß geben.

Zusammenfassung.

Die geprüften Aminosäuren Glykokoll, Alanin und Leucin (in dieser Reihenfolge mit abnehmender Eignung als Stickstoffquelle) werden bei *Bacillus glycinophilus* in Mischung besser verarbeitet als bei Einzeldarbietung, auch wenn deren Konzentration derjenigen der Mischung entspricht.

Es ist wahrscheinlich, daß jede Aminosäure ihren spezifischen Schädigungsfaktor besitzt, der vermutlich auf die Kohlenstoffkette zurückzuführen ist und daß sich diese Schädigungsfaktoren antagonistisch beeinflussen.

Literatur.

A. Rippel, Das Ertragsgesetz. In *Honcamps* Handbuch der Pflanzenernährung, Bd. I, S. 602. Berlin, Springer, 1931. — Vergleiche weiter die Darstellung in *A. Rippel-Baldes*, Grundriß der Mikrobiologie. Berlin, Springer. Im Erscheinen. — *A. Rippel* u. *W. Lohrmann*, Nachr. a. d. Gesellsch. d. Wiss. Göttingen, Mathem.-Physikal. Kl., N. F., Fachgruppe VI: Nachr. a. d. Biologie 3, 239, 1940. — *A. Rippel*, *K. Nabel* u. *W. Köhler*, diese Zeitschr. 12, 285, 1941

Unveränderter Nachdruck 1968 Springer-Verlag, Berlin / Heidelberg / New York
Fotodruck: Mikrokopie GmbH. · München 22 · Bruderstraße 9